VIRGIL DARIE **CĂTĂLINA PISOSCHI**

LABORATOR CLINIC I

Referent științific
Prof. univ. dr. **Dinu Tănăsescu**

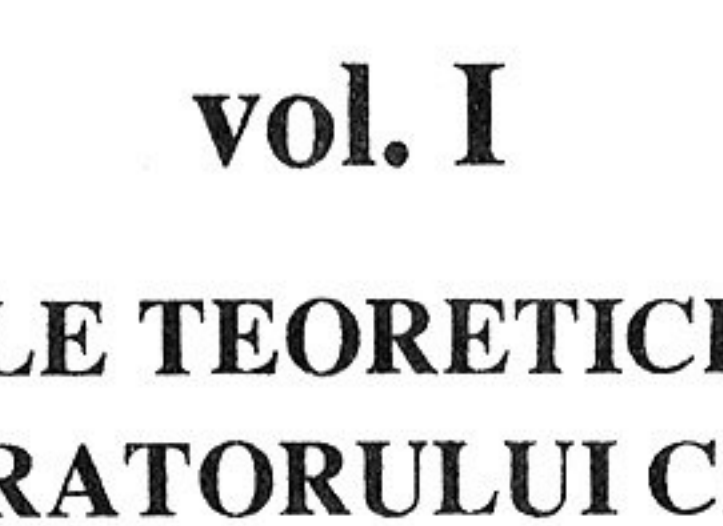
VIRGIL DARIE CĂTĂLINA PISOSCHI

LABORATOR CLINIC

- BIOCHIMIE -

vol. I

BAZELE TEORETICE ALE LABORATORULUI CLINIC



REPROGRAFIA UNIVERSITĂȚII DIN CRAIOVA
1998

„Lumină am luat
și lumină voi da,
celor ce vor lumina”

Prefață

Dezvoltarea impetuasă pe plan teoretic a biochimiei în ultimele decenii, a avut repercursiuni și pe plan aplicativ, prin perfecționarea metodologiei experimentale în acest domeniu.

Procesul de interferare a metodelor și conceptelor experimentale ale biochimiei, cu cele ale altor ramuri ale biologiei aplicate, manifestate printr-un proces amplu de conlucrare interdisciplinară a atestat importanța biochimiei analitice, ca unul din factorii determinanți pentru pregătirea complexă a viitorului specialist de laborator clinic.

Biochimia analitică este un atribut complementar și necesar pentru investigarea și interpretarea la nivel molecular a proceselor fiziologice și patologice specifice organismului uman.

Informațiile furnizate de laboratorul clinic contribuie la precizarea diagnosticului unei anumite afecțiuni, prognosticul evoluției sale și controlul eficienței terapiei.

Eforturile biochimiștilor au fost îndreptate în sensul perfecționării unui mare număr de tehnici analitice, precum și utilizarea electronicii pentru aparatura performantă fizico-chimică de analiză.

Lucrarea de față se adresează studenților din profilul medico - farmaceutic și stomatologic, dar prin tematica abordată și conținutul științific poate fi utilă și personalului care deservește laboratorul clinic (chimiști, biologi, medici).

Sperăm ca această lucrare să fie apreciată dar utilitatea ei va fi limitată în timp de dezvoltarea continuă a cunoștințelor teoretice și practice în acest domeniu, fiind necesară reactualizarea acesteia.

Mulțumim d-lui profesor universitar dr. D. Tănăsescu, care ne-a sprijinit prin numeroase observații și prețioase sugestii. Pe parcursul a 25 de ani de activitate, domnia sa ne-a imprimat un stil de muncă și abordare a metodologiei în biochimia clinică, rezultat al unei bogate experiențe în practica de laborator și cercetare științifică.

Autorii

CUPRINS

* PROTECȚIA ȘI TEHNICA SECURITĂȚII MUNCII ÎN LABORATOARELE DE BIOCHIMIE 1

* INSTRUCȚIUNI PSI 3

* MĂSURI DE PRIM AJUTOR ÎN ACCIDENTELE DE LABORATOR 4

I. ASPECTE GENERALE PRIVIND LABORATORUL CLINIC 7

I.1. STICLĂRIA DE LABORATOR 7

I.2. SPĂLAREA STICLĂRIEI DE LABORATOR 8

I.3. APA DISTILATĂ, BIDISTILATĂ ȘI DEIONIZATĂ 10

I.4. CALITATEA REACTIVILOR 11

I.5. ETAPE PREMERGĂTOARE DETERMINĂRILOR ANALITICE 12

I.5.1. PREGĂTIREA SOLUȚIILOR 12

I.5.1.1. CÂNTĂRIREA 12

I.5.1.2. BALANȚA ANALITICĂ ELECTRONICĂ 14

I.5.1.3. DIZOLVAREA SUBSTANȚELOR 15

I.5.2. ERORI ÎN PĂSTRAREA ȘI FOLOSIREA SOLUȚIILOR 17

I.5.3. ERORI ÎN PRELUCRAREA PROBELOR 18

I.5.4. MĂSURAREA VOLUMELOR DE REACTIVI 20

II. NOȚIUNI GENERALE DE ANALIZĂ CHIMICĂ 22

II.1. CONSIDERAȚII GENERALE 22

II.2. ANALIZA VOLUMETRICĂ 23

II.2.1. BAZELE TEORETICE ALE ANALIZEI VOLUMETRICE 23

II.2.2. CLASIFICAREA METODELOR DE ANALIZĂ VOLUMETRICĂ 25

II.2.3. OPERAȚIA DE TITRARE. ERORI ÎNTÂLNITE ÎN TITRAREA SOLUȚIILOR 26

II.2.4. UNITĂȚI ȘI SUBUNITĂȚI UTILIZATE ÎN LABORATORUL CLINIC 29

II.2.5. MĂRIMI UTILIZATE ÎN VOLUMETRIE 31

II.2.5.1. CALCULUL ECHIVALENTULUI GRAM 33

II.2.6. CONCENTRAȚIA SOLUȚIILOR 36
II.2.6.1. CONCENTRAȚIA MOLARĂ 37
II.2.6.2. CONCENTRAȚIA NORMALĂ 38
II.2.6.3. CONCENTRAȚIA PROCENTUALĂ 39
II.2.6.4. TITRUL SOLUȚIILOR 40
II.2.6.5. SUBSTANȚE ETALON SAU TITRIMETRICE 41
II.2.6.6. SOLUȚII REALE. FACTORUL DE CORECȚIE 43
II.2.6.7. REGULA AMESTECURILOR 45
II.3. VOLUMETRIA PRIN REACȚII DE NEUTRALIZARE 47
II.3.1. ALCALIMETRIA 47
II.3.1.1. PREPARAREA UNEI SOLUȚII APROXIMATIVE DE NaOH 0,1 N 47
II.3.1.2. DETERMINAREA FACTORULUI DE CORECȚIE AL SOLUȚIEI APROXIMATIVE DE NaOH 0,1 N 49
II.3.1.3. DOZAREA ALCALIMETRICĂ A UNEI SOLUȚII DE ACID SULFURIC 51
II.3.2. ACIDIMETRIA 52
II.3.2.1. PREPARAREA UNEI SOLUȚII APROXIMATIVE DE HCl 0,1 N 53
II.3.2.2. DETERMINAREA FACTORULUI DE CORECȚIE AL SOLUȚIEI APROXIMATIVE DE HCl 0,1 N 54
II.3.2.3. DOZAREA ACIDIMETRICĂ A SOLUȚIILOR DE HIDROXID DE SODIU 57
II.4. VOLUMETRIA PRIN REACȚII DE OXIDO - REDUCERE 58
II.4.1. GENERALITĂȚI 58
II.4.2. MANGANOMETRIA 62
II.4.2.1. PREPARAREA SOLUȚIEI DE $KMnO_4$ APROXIMATIV 0,1 N 62
II.4.2.2. DETERMINAREA FACTORULUI DE CORECȚIE AL SOLUȚIEI DE $KMnO_4$ APROXIMATIV 0,1 N 64
II.4.2.3. DOZAREA MANGANOMETRICĂ A APEI OXIGENATE 65
II.4.3. IODOMETRIA 66

II.4.3.1. PREPARAREA UNEI SOLUȚII APROXIMATIVE DE I_2 0,1 N 67

II.4.3.2. PREPARAREA SOLUȚIEI DE $Na_2S_2O_3$ APROXIMATIV 0,1 N 68

II.4.3.3. PREPARAREA UNEI SOLUȚII ETALON DE $K_2Cr_2O_7$ 0,1 N 69

II.4.3.4. DETERMINAREA FACTORULUI DE CORECȚIE AL SOLUȚIEI APROXIMATIVE DE $Na_2S_2O_3$ 0,1 N 70

II.4.3.5. DETERMINAREA FACTORULUI DE CORECȚIE AL SOLUȚIEI APROXIMATIVE DE I_2 0,1 N 71

II.4.3.6. DOZAREA IODOMETRICĂ A GLUCOZEI 72

II.5. COMPLEXOMETRIA 74

II.5.1. PREPARAREA SOLUȚIEI DE COMPLEXON III 0,05 N. 76

II.6. PH-METRIE 77

II.6.1. DEFINIȚIA PH-ULUI. SCALA PH-ULUI 77

II.6.2. INDICATORI DE PH. MECANISM DE ACȚIUNE 81

II.6.3. DETERMINAREA EXPERIMENTALĂ A PH-ULUI 85

II.6.3.1. METODA COLORIMETRICĂ GUILLAUMIN 86

II.6.3.2. DETERMINAREA PH-ULUI URINAR CU AJUTORUL HÂRTIEI INDICATOR UNIVERSAL 86

II.6.3.3. METODA ELECTROMETRICĂ 87

II.7. SOLUȚII TAMPON 88

II.7.1. CONSIDERAȚII GENERALE 88

II.7.2. MECANISM DE ACȚIUNE 89

II.7.3. SISTEME TAMPON DIN ORGANISMUL UMAN 93

II.7.3.1. SISTEMUL TAMPON AL ACIDULUI CARBONIC 94

II.7.3.2. SISTEMUL TAMPON AL PROTEINELOR 96

II.7.3.3. SISTEMUL TAMPON AL HEMOGLOBINEI 97

II.7.3.4. SISTEMUL TAMPON AL FOSFAȚILOR 99

II.7.3.5. MECANISME BIOLOGICE DE MENȚINERE A ECHILIBRULUI ACIDO - BAZIC 99

II.7.3.6. TĂRIA IONICĂ 101

III. METODE FIZICO - CHIMICE UTILIZATE ÎN BIOCHIMIE 104
III.1. FOTOCOLORIMETRIA 104
III.1.1. NOȚIUNI DE FOTOMETRIE 104
III.1.2. LEGILE COLORIMETRIEI 106
III.1.3. DEFINIREA UNOR NOȚIUNI UTILIZATE ÎN FOTOMETRIE (COLORIMETRIE) 108
III.1.4. FORMULA GENERALĂ DE CALCUL ÎN ANALIZA FOTOCOLORIMETRICĂ 109
III.1.5. SPECTROFOTOMETRUL TIP „SPEKOL” 111
III.2. CENTRIFUGAREA. ULTRACENTRIFUGAREA 114
III.2.1. GENERALITĂȚI 114
III.2.2. TEORIA CENTRIFUGĂRII 115
III.2.3. TIPURI DE CENTRIFUGARE. APLICAȚII 119
III.3. ELECTROFOREZA 122
III.3.1. BAZELE TEORETICE ALE ELECTROFOREZEI 122
III.3.2. COMPORTAREA ELECTROFORETICĂ A PROTEINELOR 126
III.3.3. ELECTROFOREZA ÎN GELURI A PROTEINELOR 127
III.3.3.1. ELECTROFOREZA ÎN GEL DE AMIDON 128
III.3.3.2. ELECTROFOREZA ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ 128
III.4. ANALIZA CROMATOGRAFICĂ 130
III.4.1. CONSIDERAȚII GENERALE 130
III.4.2. CROMATOGRAFIA AMINOACIZILOR PE HÂRTIE 131
III.4.2.1. CONSIDERAȚII GENERALE 131
III.4.2.2. PRINCIPIUL METODEI 132
III.4.2.3. TIPURI DE CROMATOGRAFIE PE HÂRTIE 133
III.4.3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUDERE MOLECULARĂ. GEL - FILTRAREA 142
III.4.3.1. CONSIDERAȚII GENERALE 142
III.4.3.2. TEORIA GEL - FILTRĂRII 145
III.4.4. CROMATOGRAFIA PROTEINELOR PE SCHIMBĂTORI DE IONI 147

III.4.4.1. PRINCIPIUL ȘI MECANISMUL DE SCHIMB IONIC 147
III.4.4.2. TIPURI DE SCHIMBĂTORI DE IONI 150
III.4.4.3. CARACTERIZAREA GENERALĂ A UNOR SCHIMBĂTORI DE IONI 151
III.5. METODA FLAMFOTOMETRICĂ 152
IV. MATERIALE BIOLOGICE 155
IV.1. SÂNGELE 155
IV.1.1. GENERALITĂȚI. FUNCȚIILE SÂNGELUI 155
IV.1.2. RECOLTAREA SÂNGELUI 157
IV.1.3. PLASMA ȘI SERUL 158
IV.1.4. ANTICOAGULANȚI 159
IV.1.5. COMPOZIȚIA SÂNGELUI 162
IV.1.6. SURSE DE ERORI ÎNTÂLNITE ÎN DETERMINĂRILE BIOCHIMICE 164
IV.1.6.1. HEMOLIZA 164
IV.1.6.2. SERUL SAU PLASMA ICTERICĂ 164
IV.1.6.3. SERUL SAU PLASMA LIPEMICĂ 165
IV.1.7. CONSERVAREA SERULUI SAU PLASMEI 165
IV.2. URINA 166
IV.2.1. GENERALITĂȚI DESPRE FUNCȚIILE RINICHILOR 166
IV.2.1.1. CIRCULAȚIA SANGUINĂ RENALĂ 166
IV.2.1.2. FILTRAREA GLOMERULARĂ 167
IV.2.1.3. REABSORBȚIA ȘI SECREȚIA TUBULARĂ 169
IV.2.2. COMPOZIȚIA URINEI 171
IV.2.3. RECOLTAREA ȘI CONSERVAREA URINEI 172
IV.2.3.1. RECOLTAREA URINEI 172
IV.2.3.2. CONSERVAREA URINEI 173
IV.2.4. CARACTERISTICILE FIZICO - CHIMICE ALE URINEI 173
IV.2.4.1. ASPECTUL GENERAL 174
IV.2.4.2. CULOAREA 174

IV.2.4.3. MIROSUL 176

IV.2.4.4. CONSISTENȚA 176

IV.2.4.5. VOLUMUL URINEI 177

IV.2.4.6. DENSITATEA 180

IV.2.4.7. PH-UL URINAR 181

IV.2.5. ANALIZA FIZICO - CHIMICĂ A URINEI 181

IV.2.5.1. DETERMINAREA DENSITĂȚII URINARE 182

IV.2.5.2. DOZAREA ACIDITĂȚII TOTALE URINARE. METODA MALY - DËNIGES 183

IV.2.6. EXAMENUL SUMAR DE URINĂ 184

IV.2.6.1. SEDIMENTUL URINAR 184

IV.2.6.2. SEDIMENTUL NEORGANIZAT 185

IV.2.6.2.1. SEDIMENTUL URINEI ACIDE 185

IV.2.6.2.2. SEDIMENTUL URINEI ALCALINE 186

IV.2.6.2.3. SEDIMENTE MAI RAR ÎNTÂLNITE îN URINA PATOLOGICĂ 186

IV.2.6.2.4. SEDIMENTE CONȚINÂND CRISTALE DE SULFAMIDE 187

IV.2.6.3. SEDIMENTUL ORGANIZAT 188

IV.2.6.3.1. ELEMENTELE CELULARE 188

IV.2.6.3.2. CILINDRI URINARI. ALTE ELEMENTE 188

IV.2.7. CALCULII URINARI 189

IV.2.7.1. EXAMENUL FIZICO-CHIMIC A UNUI CALCUL 190

IV.3. LICHIDUL CEFALORAHIDIAN (LCR) 192

IV.3.1. GENERALITĂȚI DESPRE FIZIOLOGIA LCR 192

IV.3.2. FORMAREA LCR 193

IV.3.2.1. ROLURILE LCR 193

IV.3.3. COMPOZIȚIA LCR 194

IV.3.3.1. COMPONENTA BIOCHIMICĂ 195

IV.3.3.2. COMPONENTA CELULARĂ A LCR 197

IV.3.4. CARACTERISTICILE FIZICE ALE LCR 197
IV.3.5. RECOLTAREA LCR 198
IV.4. SALIVA. 199
IV.4.1. FORMAREA SALIVEI 199
IV.4.2. COMPOZIȚIA SALIVEI 201
IV.4.3. CARACTERISTICILE FIZICO-CHIMICE ALE SALIVEI 202
IV.4.4. ROLURILE SALIVEI 203
IV.4.5. RECOLTAREA SALIVEI 204
IV.5. EXTRACTE TISULARE 205
IV.5.1. GENERALITĂȚI 205
IV.5.2. EXTRACTE TISULARE UMANE 205
IV.5.3. OMOGENIZAREA MATERIALULUI DE BIOPSIE 207
V. BIOCHIMIA ANALITICĂ CALITATIVĂ 210
V.1. AMINOACIZI 210
V.1.1. REACȚII GENERALE DE IDENTIFICARE 210
V.1.1.1. FORMAREA DE SĂRURI COMPLEXE 210
V.1.1.2. REACȚIA CU ACIDUL AZOTOS (VAN SLYKE) 213
V.1.1.3. REACȚIA SÖRENSEN (CU ALDEHIDELE) 214
V.1.1.4. REACȚIA CU NINHIDRINĂ 214
V.1.2. REACȚII PARTICULARE 216
V.1.2.1. REACȚIA XANTOPROTEICĂ 216
V.1.2.2. REACȚIA MILLON 217
V.1.2.3. REACȚIA PAULY 218
V.1.2.4. REACȚIA SAKAGUCHI - WEBER 220
V.1.2.5. REACȚIA ADAMKIEWICZ - HOPKINS - COLE 221
V.1.2.6. REACȚIA PETTENKOFER 223
V.1.2.7. REACȚIA CU ISATINA 224
V.1.2.8. IDENTIFICAREA AMINOACIZILOR CU SULF 225
V.2. PROTEINE 227

V.2.1. GENERALITĂȚI 227
V.2.2. EXTRACȚIA ȘI IZOLAREA PROTEINELOR 228
V.2.2.1. FACTORII DENATURĂRII 229
V.2.2.2. TEORIA PRECIPITĂRII CU SĂRURI NEUTRE 230
V.2.2.3. DIALIZA 232
V.2.2.4. PRECIPITAREA CU SOLVENȚI NEPOLARI 235
V.2.2.5. CRITERII DE PURITATE A PROTEINELOR 236
V.2.3. PROPRIETĂȚILE ELECTROCHIMICE ALE PROTEINELOR 237
V.2.3.1. CARACTERIZAREA PUNCTULUI IZOELECTRIC 237
V.2.3.2. DETERMINAREA PUNCTULUI IZOELECTRIC AL PROTEINELOR 239
V.2.4. REACȚII DE IDENTIFICARE ȘI CARACTERIZARE A PROTEINELOR 240
V.2.4.1. REACȚIA BIURETULUI 241
V.2.5. REACȚII DE CULOARE ALE PROTEINELOR DATORATE AMINOACIZILOR COMPONENȚI 243
V.2.6. REACȚII DE PRECIPITARE A PROTEINELOR 243
V.2.6.1. REACȚII DE PRECIPITARE REVERSIBILE 244
V.2.6.2. REACȚII DE PRECIPITARE IREVERSIBILE (DENATURARE) 245
V.2.6.3 DEPROTEINIZAREA LICHIDELOR BIOLOGICE 248
V.3. GLUCIDE 250
V.3.1. GENERALITĂȚI 250
V.3.2. REACȚIA DE DIFERENȚIERE A OZELOR DE ALDEHIDE. REACȚIA SCHIFF 251
V.3.3. REACȚII CARE PUN ÎN EVIDENȚĂ CARACTERUL REDUCĂTOR AL GLUCIDELOR 253
V.3.3.1. REACȚIA FEHLING 254
V.3.3.2. REACȚIA TROMMER 257
V.3.3.3. REACȚIA BENEDICT 257
V.3.3.4. REACȚIA BARFOED 258

V.3.3.5. REACȚIA NYLANDER 259
V.3.3.6. REACȚIA TOLLENS 260
V.3.3.7. REACȚIA CU ACID PICRIC 261
V.3.4. REACȚII DE CULOARE ALE GLUCIDELOR 262
V.3.4.1. PRINCIPIUL REACȚIILOR. CLASIFICARE 262
V.3.4.2. REACȚIA MOLISCH - UDRANSZCHI 264
V.3.4.3. REACȚIA CU TIMOLUL 265
V.3.4.4. REACȚIA DREIWOOD (CU ANTRONA) 266
V.3.4.5. REACȚIA UNIVERSALĂ THOMAS 267
V.3.4.6. REACȚIA BIAL 268
V.3.4.7. REACȚIA PIERRE - THOMAS 269
V.3.4.8. REACȚIA TOLLENS (FLOROGLUCINĂ) 270
V.3.4.9. REACȚIA SELIWANOFF 270
V.3.5. REACȚIA DE CONDENSARE CU FENILHIDRAZINA (DÉNIGÉS) 272
V.3.6. REACȚII DE IDENTIFICARE A DIZAHARIDELOR 274
V.3.7. REACȚII DE IDENTIFICARE A POLIZAHARIDELOR 276
V.3.8. ANALIZA UNUI AMESTEC DE GLUCIDE 278
V.4. LIPIDE 282
V.4.1. GENERALITĂȚI 282
V.4.2. IDENTIFICAREA LIPIDELOR TOTALE 283
V.4.3. REACȚII DE IDENTIFICARE A GLICEROLULUI 285
V.4.3.1. DESHIDRATAREA GLICEROLULUI 285
V.4.3.2. OXIDAREA GLICEROLULUI 286
V.4.4. PREPARAREA ȘI PROPRIETĂȚILE SĂPUNURILOR 288
V.4.5. CARACTERIZAREA ANALITICĂ A LIPIDELOR 290
V.4.5.1. DETERMINAREA INDICELUI DE SAPONIFICARE 290
V.4.5.2. DETERMINAREA INDICELUI DE IOD 293
V.4.5.3. DETERMINAREA INDICILOR DE PEROXID ȘI DE ACIDITATE 295

V.4.6. REACȚII DE IDENTIFICARE A COLESTEROLULUI 298

V.4.6.1. PRINCIPIUL REACȚIILOR DE IDENTIFICARE A COLESTEROLULUI 299

V.4.7. SĂRURILE BILIARE 301

V.4.7.1. IDENTIFICAREA SĂRURILOR BILIARE 301

ANEXE 303

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ 307

* PROTECȚIA ȘI TEHNICA SECURITĂȚII MUNCII ÎN LABORATOARELE DE BIOCHIMIE

În laboratoarele de biochimie se efectuează o gamă foarte variată de lucrări care necesită nu numai un număr mare de reactivi organici și anorganici, dintre care mulți sunt toxici sau caustici, ci și diverse aparate și utilaje. Aceasta impune respectarea strictă a unor norme de protecția muncii și tehnica securității laboratoarelor.

Pentru a evita accidentele în timpul experiențelor de laborator sau analizelor curente în laboratorul clinic trebuie respectate cu strictețe următoarele reguli:

► lucrările și experiențele se efectuează conform tehnicii de lucru adecvate fiecărei lucrări;

► vasele cu care se lucrează trebuie să fie curate, iar după întrebuințare spălate și clătite cu apă distilată;

► sticlele de reactivi trebuie să fie etichetate corect, formulele să fie scrise citeț, iar după folosire nu trebuie lăsate deschise pe masă ca să nu se schimbe dopurile de la o sticlă la alta;

► turnarea reactivilor din sticlă se face prin partea opusă etichetei, deoarece soluțiile corozive ce se preling pe pereți pot distruge eticheta;

► mirosirea substanțelor chimice nu se face prin apropierea nasului direct la gâtul sticlei, ci prin antrenarea spre nas cu ajutorul palmei a unui curent de aer ce conține vaporii substanței respective;

► substanțele toxice trebuie manipulate cu foarte mare atenție, în restul timpului se țin sub cheie, în borcane sau sticle care să menționeze toxicitatea lor printr-un **„cap de mort”**;

► când se fac experiențe în eprubete, capătul deschis al acestora trebuie să fie îndreptat spre perete sau într-o direcție în care nu se află nimeni;

► nu se aruncă în chiuvete hârtie de filtru, sticle sparte, resturi de acizi sau baze pentru a nu se înfunda sau coroda instalația;

► când se transvazează reactivi care reacționează violent cu apa, de exemplu H_2SO_4, vasul în care se aduce substanța trebuie să fie perfect uscat. De asemenea, H_2SO_4 concentrat se prelinge cu atenție pe pereții eprubetei pentru a preveni reacțiile violente;

► este interzisă păstrarea alimentelor în frigidere cu produse biologice pentru a evita pericolul de infectare și contaminare;

► se interzice consumarea apei din vasele de laborator;

► se interzice fumatul și consumarea alimentelor în laborator;

► prepararea soluțiilor de acizi minerali sau substanțe cu vapori toxici se execută în încăperi prevăzute cu nișă, exhaustor și ventilație electrică;

► înaintea părăsirii laboratorului se spală toate vasele folosite și se pune în ordine trusa de lucru;

► pentru a preîntâmpina distrugerea hainelor prin stropirea cu substanțe, în laborator este obligatorie folosirea halatului;

► la plecarea din laborator se verifică dacă becurile de gaz și robinetele de apă sunt închise, instalația electrică deconectată;

► podelele laboratoarelor se spală cu apă sodată, detergenți sau soluții antiseptice (fenol, crezol);

► în fiecare laborator trebuie să existe o trusă medicală care să conțină un minim de materiale și soluții pentru primul ajutor:

- soluție acid acetic 2%;
- soluție bicarbonat de sodiu 2%;
- soluție acid boric 4%;
- apă oxigenată 3%;
- alcool etilic 96% sau spirt medicinal;
- tiosulfat de sodiu 2%;
- un tub cu unguent pentru arsuri;
- vată hidrofilă, comprese sterile, leucoplast, pipetă și un pahar special pentru spălat ochii;
- antinevralgice, cardiotonice, antiseptice, calmante, fești, tifon.

* INSTRUCȚIUNI PSI

În fiecare laborator trebuie să se manipuleze cu foarte mare grijă substanțele inflamabile și aparatele care ar putea să determine declanșarea unor incendii.

- fumatul este strict interzis în laboratoarele unde se lucrează cu substanțe inflamabile;
- în laboratoare nu se vor păstra decât cantitățile strict necesare de lichide inflamabile și volatile (eter, benzen etc.);
- înainte de folosirea unor substanțe inflamabile se sting toate becurile de gaz;
- lichidele inflamabile nu se încălzesc direct la flacără, ci pe baie de apă, de nisip sau electrică sub nișe cu tiraj corespunzător;
- este interzisă încălzirea în vase de sticlă a unor volume de lichide mai mari de 1 litru;
- golirea reziduurilor din aparatele de distilare nu trebuie să se facă imediat după terminarea distilării, ci numai după ce temperatura a scăzut sub punctul de aprindere al materialului;
- trebuie să se evite autoaprinderea unor substanțe (fosfor alb, nitroderivați, eter etilic etc.), nefiind indicată depozitarea timp îndelungat în zone expuse la soare;
- cromatografia și electroforeza se efectuează în încăperi izolate de restul laboratorului și prevăzute cu ventilatoare electrice;
- tuburile de oxigen, dioxid de carbon, acetilenă și azot lichid se depozitează într-o încăpere izolată;
- aparatele electrice (ultracentrifugă, termostate, frigidere, spectrofotometre) trebuie să aibă prizele împământate și izolare electrică perfectă;
- fiecare laborator trebuie să fie dotat cu extinctor și personal instruit pentru utilizarea acestuia în caz de incendiu.

* MĂSURI DE PRIM AJUTOR ÎN ACCIDENTELE DE LABORATOR

În funcție de natura accidentului care a apărut, se iau imediat următoarele măsuri de prim ajutor:

I. Arsuri termice

În această situație se îndepărtează resturile de îmbrăcăminte și, în funcție de gradul arsurii, se va proceda astfel:

► arsuri de gradul I (**roșeață**) - se tamponează arsura cu alcool etilic 96% sau spirt medicinal;

► arsuri de gradul II (**băsici**) - se tamponează locul cu vată îmbibată în alcool etilic 96% sau spirt medicinal și apoi cu o soluție de permanganat de potasiu 5% sau o soluție de tanin 5%;

► arsuri de gradul III (**distrugerea țesutului**) - se îndepărtează de pe rană resturile de substanță toxică, după care se acoperă rana cu un pansament steril până la intervenția medicului.

Dacă se aprinde îmbrăcămintea, accidentatul se va arunca la pământ și se va acoperi cu o pătură udă pentru a stinge focul.

II. Arsuri chimice

După contactul suprafeței corpului cu o substanță corozivă se spală locul cu multă apă și se neutralizează arsurile în funcție de natura agentului coroziv:

• arsuri provocate de acizi tari - se spală cu o soluție de bicarbonat de sodiu 2%;

• arsuri provocate de baze tari - se spală cu soluție de acid boric 4% sau acid acetic 2%;

• arsuri cu brom, iod sau acid bromhidric - se tamponează cu o soluție de tiosulfat de sodiu 2%.

În cazul când substanța corozivă a atins ochii sau a pătruns în cavitatea bucală ca urmare a unei pipetări necorespunzătoare, se realizează o spălare cu apă din abundență și apoi se neutralizează în funcție de natura chimică a agentului coroziv.

Spălarea ochiului se face cu pipeta fie cu ajutorul unui păhărel special.

III. Intoxicații acute

În aceste cazuri accidentatul este scos din mediul toxic și transportat într-o încăpere bine aerisită. Este așezat în poziția culcat și i se îndepărtează îmbrăcămintea până la sosirea medicului. Dacă se cunoaște substanța care a provocat intoxicarea se va proceda astfel:

➢ în cazul intoxicațiilor cu acizi se va face o gargară cu soluție de bicarbonat de sodiu 5%. Se bea lapte și o suspensie de 10 g oxid de magneziu la 150 ml apă sau apă de var și ulei;

➢ în cazul intoxicațiilor cu amoniac se bea multă apă cu oțet sau suc de lămâie. Se provoacă vomitări, se bea ulei, lapte sau albuș de ou;

➢ pentru intoxicații cu hidrogen sulfurat se scoate accidentatul din mediul toxic, i se face respirație artificială, apoi i se dă să respire oxigen cu 5% CO_2. Se recomandă inspirarea unei soluții de clorură de var. În cazul vătămării ochilor se aplică compresă cu acid boric 3%;

➢ pentru intoxicațiile cu clor, accidentatului i se fac inhalații cu soluție de hiposulfit de sodiu 2%, i se spală ochii, nările și gura cu o soluție de bicarbonat de sodiu 5% și i se dă să bea lapte sau cafea fierbinte;

➢ pentru intoxicații cu compuși ai mercurului se beau trei ouă crude cu aproximativ 1 litru lapte, apoi se provoacă vomitări;

➢ pentru intoxicații cu compuși ai plumbului se bea o cantitate mare de sulfat de magneziu, după care se provoacă vomitări;

➢ în intoxicațiile cu compuși ai argintului se bea o cantitate mare de ser fiziologic (NaCl 0,9%);

➢ pentru intoxicații cu acid cianhidric sau cianuri, accidentatului i se dă să inhaleze **azotit de amil** impregnat într-un tampon de vată:

• se injectează apoi intravenos 15 ml soluție 2-10% de azotit de sodiu 2-10% sau,

• 50 ml soluție albastru de metilen 1% în soluție de glucoză 25%;

• la 3-5 minute de la injectarea azotitului de sodiu i se administrează accidentatului intravenos 10-20 ml soluție hiposulfit 30%;

• inhalările cu azotit de amil se repetă la fiecare 2-3 minute câte 15-30 secunde;

• în funcție de simptomele intoxicației se pot repeta injecțiile;

• la apariția unor tulburări respiratorii, i se face accidentatului respirație artificială, i se injectează intravenos 0,5 ml lobelină 1% sau i se administrează medicamente care stimulează respirația (cofeină, ulei camforat).

*

* *

Pentru desfășurarea în condiții optime a activității în laborator, întregul personal didactic, ajutător și studenții trebuie să cunoască și să respecte regulile de protecție a muncii și de prevenire a toxicității și accidentelor de muncă.

Lăsați trusa de reactivi în ordine, sticlăria de laborator spălată și uscată, încăperea aerisită, locul de muncă curat, așa cum și dumneavoastră doriți să le găsiți, când vă integrați în activitatea de zi cu zi.

I. ASPECTE GENERALE PRIVIND LABORATORUL CLINIC

I.1. STICLĂRIA DE LABORATOR

În laboratoarele de chimie clinică sunt folosite concomitent metode calitative și cantitative. În ambele cazuri, pentru executarea analizelor este necesară prepararea în prealabil a reactivilor care vor fi utilizați, operație ce decurge după anumite norme care trebuie respectate cu strictețe.

Atât prepararea reactivilor, cât și analizele de laborator se execută în vase de sticlă. Caracteristicile sticlei ca:

- transparență;
- pasivitate față de majoritatea agenților chimici;
- rezistență mecanică și termică;
- posibilitatea de curățire după întrebuințare;
- costul relativ mic în comparație cu al altor materiale;

au determinat utilizările multiple ale acestui material în toate laboratoarele cu profil chimic.

Sticlăria de laborator se poate clasifica astfel:

► sticlărie de **uz curent**: eprubete, baloane de diverse tipuri, pahare Berzelius, pahare conice Erlenmeyer, pâlnii de filtrare, pâlnii de separare, cristalizatoare, sticle de ceas, fiole de cântărire de diverse capacități și mărimi;

► ustensile de sticlă pentru **măsurarea volumelor**: baloane cotate, biurete, cilindri gradați, pipete gradate, pipete cotate, micropipete, pipete cu autoumplere, pipete de transfer, dispensere, dilutoare etc;

► sticlărie pentru **păstrarea** reactivilor: sticle și borcane incolore sau brune de diferite capacități;

► alte ustensile de sticlă: albuminometre, densitometre, exicatoare, refrigerente etc.

Etalonarea vaselor de sticlă se face la 20°C, temperatură ușor de realizat și care este indicată de normele internaționale pentru gradarea vaselor de sticlă.

I.2. SPĂLAREA STICLĂRIEI DE LABORATOR

Înainte de folosirea sticlăriei trebuie să ne asigurăm dacă aceasta este **intactă**, **curată** și, în cele mai multe cazuri, dacă este **uscată**. Spălarea se face în mai multe etape:

A. Spălarea preliminară

Pentru spălare, sticlăria de laborator utilizată se va introduce într-un vas cu apă caldă. Pipetele și biuretele se vor introduce într-un cilindru gradat cu apă caldă. Precipitatele aderente la pereții interiori ai sticlăriei de laborator se îndepărtează cu o perie. Pentru o spălare obișnuită este satisfăcătoare folosirea detergenților în apă caldă.

B. Spălarea cu acizi și baze

a) În mod curent se folosesc pentru spălarea sticlăriei KOH 10% (10 g KOH + apă distilată până la 100 ml) sau KOH alcoolic (100 g KOH dizolvat în 100 ml apă distilată, se răcește și se adaugă 900 ml alcool etilic comercial).

Pipetele și eprubetele care conțin urme de sânge sau urină se introduc în soluție de KOH 10% timp de 24 de ore.

b) Pentru îndepărtarea precipitatelor insolubile în apă și pentru degresarea vaselor de sticlă se utilizează amestecul **sulfocromic** format din dicromat de potasiu și acid sulfuric concentrat în raport de 5:10. Acesta se prepară astfel: într-un vas cu capacitatea de 1 litru, se introduc 500 ml apă distilată, în care se adaugă 100 g dicromat de potasiu mojarat, se adaugă apoi 230 ml acid sulfuric concentrat prelingând pe pereți cu precauție și agitând continuu. Dacă soluția se încălzește, aceasta se va răci în curent de apă de la robinet. După completa dizolvare se adaugă apă distilată până la 1 litru. Soluția astfel obținută este necesar să fie filtrată prin vată de sticlă pentru a nu se înfunda

pipetele. Amestecul sulfocromic se manipulează cu atenție, evitându-se contactul cu pielea sau cu îmbrăcămintea.

Amestecul sulfocromic se introduce în vasul de curățat până la aproximativ 1/4 din volumul total și apoi se agită prin mișcarea vasului în diferite direcții. După utilizare, amestecul sulfocromic se trasvazează într-un vas putând fi întrebuințat de mai multe ori.

Se consideră că amestecul sulfocromic este activ numai când are culoarea **chihlimbarului** și **consistență uleioasă**. Dacă virează culoarea spre **verde** este un indiciu că au apărut ionii cromici și amestecul nu mai poate fi utilizat, fiind epuizat.

Biuretele, pipetele, micropipetele se vor introduce în amestec sulfocromic timp de 12 - 24 ore.

C. Spălarea cu apă

Vasele de laborator spălate cu detergenți, acizi sau baze, se clătesc de mai multe ori cu apă de robinet, după care operația se repetă de 4 - 5 ori cu apă distilată.

Vasele de sticlă cu urme de detergenți sau acizi pot genera erori mari în determinările de biochimie clinică, fie prin schimbarea pH-ului, fie prin interferență în reacția chimică.

După spălare vasele se pot usca în stative speciale, în etuve la 110°C timp de 1 - 2 ore, cu ajutorul unui suflător electric sau cu ajutorul substanțelor organice volatile (acetonă, alcool etilic, eter).

Proba unei bune spălări se face cu apă distilată cu care se clătește vasul, urmărind dacă apa umectează toată suprafața pereților.

În caz contrar, vasul de laborator nu este curat și trebuie repetată operația de spălare.

Dacă, din motive bine întemeiate, s-au utilizat vase din material plastic, curățirea acestora se realizează mecanic și cu detergenți, urmată de clătirea repetată cu apă de robinet, operație finalizată apoi cu apă distilată.

I.3. APA DISTILATĂ, BIDISTILATĂ ȘI DEIONIZATĂ

În laboratoarele de chimie clinică, pentru prepararea reactivilor se utilizează, în general, apa distilată, care se poate obține cu ajutorul unui distilator metalic sau din sticlă. În aceste condiții apa distilată mai conține doar urme de metale: Cu, Zn, Pb, Fe etc.

În microanalize și în studii enzimologice se recomandă întrebuințarea apei **bidistilate** obținută în vase de sticlă sau a apei **deionizate**.

Apa bidistilată se obține din apa distilată, redistilarea făcându-se într-un distilator constituit din vase de sticlă neutră, fără dopuri de cauciuc sau plută, de preferat sticlă de Jena.

Impuritățile de natură anorganică existente în apa distilată sunt îndepărtate prin utilizarea unei soluții diluate de permanganat de potasiu care se adaugă în balonul de fierbere până la colorarea apei în roz persistent. Pentru omogenizarea fierberii, se adaugă în balonul de distilare câteva bucăți de porțelan poros. Pentru ca debitul de scurgere a apei bidistilate să nu fie mare, este necesar să se regleze mărimea flăcării.

Apa bidistilată folosită în laborator nu trebuie să lase reziduuri prin evaporare la sec, să aibă un pH cuprins între 5,5 - 6,6 și să nu producă opalescență când este tratată cu azotat de argint, clorură de bariu sau oxalat de amoniu.

De asemenea, se recomandă păstrarea apei bidistilate în sticle de Jena sau Pyrex.

Apa deionizată se obține după trecerea apei distilate prin coloane de schimbători de ioni, mai întâi prin coloana de cationiți (forma H), care conține cationii și apoi, printr-o coloană cu anioniți (forma OH) care conține anionii. Regenerarea cationitului se face cu o soluție de HCl 5 - 6%, iar a anionitului cu o soluție de NaOH 3 - 4%.

Pentru deionizarea apei este recomandabilă utilizarea de Amberlite MB-3, care conține un indicator al gradului de epuizare al coloanei.

I.4. CALITATEA REACTIVILOR

Reactivii întrebuințați în laboratoarele de chimie clinică trebuie să îndeplinească anumite condiții de puritate, impuse de standardele existente.

Reactivii livrați de producători pentru uzul laboratoarelor sunt de mai multe categorii:

- **reactivi chimic puri** (**c.p.**) - a căror puritate permite utilizarea lor pentru analize curente;
- **reactivi pentru analiză** (**p.a.**) - substanțe de mare puritate folosite pentru analize chimice de mare precizie;
- **kit-uri de reactivi** - reprezintă truse cu toți reactivii, inclusiv standardul de lucru, pentru efectuarea unui tip de analiză după tehnici cunoscute sau modificate.

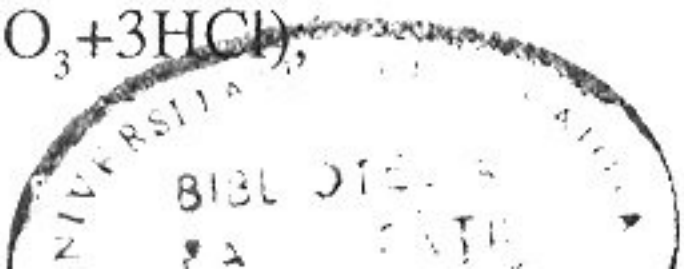
Folosirea kit-urilor în laboratorul clinic, necesită verificarea lor în paralel cu metoda folosită curent, cât și cu serurile de control.

Avantajul folosirii kit-urilor constă în rapiditatea și precizia execuției analizelor, nefiind necesară operația de pregătire a soluțiilor de lucru și a standardului, adjuvanții stabilizatori utilizați permițând folosirea îndelungată a acestora.

În analizele enzimatice, prezentarea reactivilor instabili în formă liofilizată este avantajoasă pentru acuratețea execuției analizelor.

Reactivii și substanțele chimice utilizate în laboratorul clinic sunt ambalate în vase de sticlă (borcane, fiole, sticle albe sau brune), cutii metalice sau din material plastic.

- ► fiecare ambalaj poartă o etichetă pe care sunt înscrise denumirea, puritatea, impuritățile, masa moleculară și eventual formula reactivului;
- ► păstrarea soluțiilor se face în ambalaje de sticlă cu dop etanș;
- ► pentru păstrarea soluțiilor care acționează asupra sticlei este recomandabil a se utiliza vasele din polietilenă sau din teflon care rezistă la acțiunea alcaliilor, acizilor și chiar a **apei regale** (HNO_3+3HCl);



► nu este permisă păstrarea solvenților organici în vase de polietilenă;

► păstrarea etaloanelor de sodiu și potasiu în flacoane de sticlă nu este recomandată;

► sticlele brune se utilizează pentru soluțiile care trebuie ferite de lumină;

► pentru soluțiile care au limită de utilizare nu este indicată folosirea lor după data de expirare, care trebuie obligatoriu să fie înregistrată pe flacon.

I.5. ETAPE PREMERGĂTOARE DETERMINĂRILOR ANALITICE

I.5.1. PREGĂTIREA SOLUȚIILOR

Prepararea soluțiilor se face prin dizolvarea în apă distilată sau alți solvenți, la rece sau la cald, a diferitelor substanțe, în anumite proporții, după o prealabilă cântărire a acestora.

O serie de factori concură la obținerea unor soluții utilizate în laboratorul clinic:

- funcționalitatea balanței analitice;
- puritatea substanței chimice și a apei utilizate;
- folosirea de vase volumetrice adecvate.

Dacă unul din factorii de mai sus este neglijat vor apărea erori inevitabile.

I.5.1.1. CÂNTĂRIREA

Principala operație de care depinde buna pregătire a unei soluții de utilitate analitică este **cântărirea**. Pentru efectuarea operațiilor de cântărire a substanțelor necesare preparării soluțiilor folosite în analiza cantitativă se utilizează balanța. După precizia cântăririi, în laboratorul clinic se utilizează mai multe tipuri de balanțe: tehnice, farmaceutice și analitice.

Toate tipurile de balanțe sunt construite și funcționează pe **principiul pârghiilor**, fiind prevăzute cu un amortizor care, după un număr de oscilații, oprește acul indicator.

Caracteristica principală pentru toate tipurile de balanțe, dar mai ales pentru balanțele analitice, este **sensibilitatea**, adică greutatea minimă care provoacă o deviere a acului indicator. În general, sensibilitatea balanței trebuie să fie o mărime constantă, care să nu varieze în funcție de sarcina de cântărit.

Balanțele analitice semiautomate oferă posibilitatea unei cântăriri rapide, cu o mare exactitate (4 zecimale) și permit citirea pe ecran a cantității de substanță din fiola de cântărire depusă pe platan.

Pentru utilizarea corectă a balanței analitice este necesar să se respecte cu strictețe următoarele reguli de cântărire:

- balanța analitică se conectează la sursa de curent electric pentru a lumina scala gradată;
- balanța analitică trebuie să fie **perfect curată**, fără urme de praf;
- deschiderea și închiderea balanței se fac încet, **fără manipulări bruște**, evitându-se orice șoc;
- înaintea cântăririi trebuie să se stabilească și **să se verifice „punctul zero"** al balanței;
- **substanțele** de cântărit se așează în fiole de cântărire **pe platanul din stânga** al balanței, iar **masele etalonate pe cel din dreapta**;
- balanța analitică **nu se încarcă niciodată peste sarcina maximă**;
- obiectele sau substanțele ce se cântăresc trebuie să aibă **temperatura încăperii** special amenajate în care se află balanța;
- balanța analitică trebuie **să fie oprită** în timpul încărcării sau descărcării sale;
- cântărirea se face cu **ușile balanței închise**;
- masele etalonate de ordinul gramelor se păstrează **în cutii speciale** închise;

◆ masele etalonate se manipulează **numai cu penseta** (gramele) și cu **ajutorul dispozitivului de manevrare** a maselor etalonate (zecimile și sutimile de grame);

◆ toate cântăririle necesare în efectuarea unei anumite analize sau a unui grup de analize **se execută la aceeași balanță** analitică și cu aceeași cutie de mase etalonate (greutăți analitice);

◆ odată terminată operația de cântărire, balanța se descarcă de obiectul cântăririi și greutățile analitice, iar ușile balanței se închid;

◆ se întrerupe alimentarea cu curent electric a balanței și se acoperă.

I.5.1.2. BALANȚA ANALITICĂ ELECTRONICĂ

Balanțele electronice combină numeroase moduri de cântărire și posibilități de ajustare cu o mare ușurință în operare.

Deși diferite ca prezentare și performanțe (figura I.1.), balanțele electronice prezintă următoarele avantaje:

◆ format compact și dimensiuni reduse;

◆ calibrare internă automată cu masă internă încorporată (sau cu masă externă);

◆ tastatură adaptabilă pentru o singură operare;

◆ precizie ridicată la afișare;

◆ funcție internă pentru numărare de piese, cântărire în procente, prepararea unor amestecuri;

◆ interfață încorporată ce permite adaptarea la dispozitive periferice (de exemplu, imprimante).

Tabelul I.1. prezintă câteva caracteristici ale unei balanțe electronice de tip AG104 (Mettler).

Operarea cu o balanță electronică se realizează astfel:

• se pornește balanța acționând tasta „ON";

• se calibrează balanța adaptându-se condițiilor de lucru;

• se așează pe platan fiola de cântărire și i se face tara. Presiunea pe care o exercită asupra platanului este înregistrată de un

traductor, transformată în greutate și afișată pe ecranul cu cristale lichide al balanței;

• se adaugă în fiolă substanța ce trebuie cântărită până când pe ecran apare cantitatea dorită.

TABELUL I.1. CARACTERISTICILE BALANȚEI ELECTRONICE AG104.

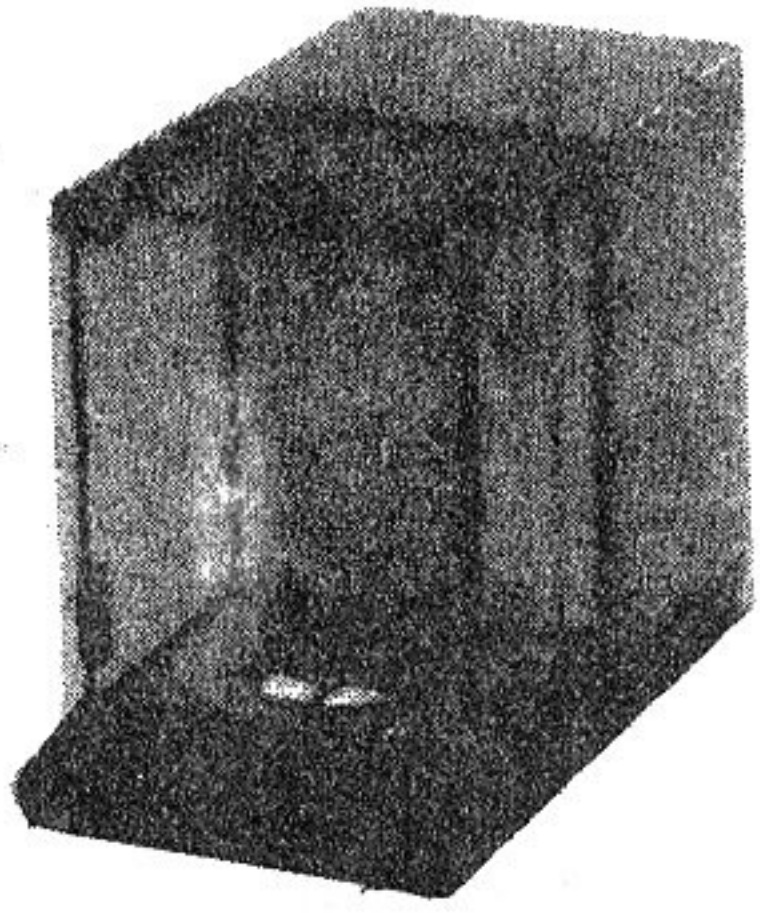
Caracteristică	AG104
◆ Precizie	0,1 mg
◆ Capacitate maximă	101 g
◆ Domenii de tarare	0 ... 101 g
◆ Repetabilitate	0,1 mg
◆ Liniaritate	± 0,2 mg
◆ Masă de calibrare internă	100 g
◆ Masă de calibrare externă	50/100 g
◆ Temperatură admisibilă	5-40ºC
◆ Unitate de măsură	g, mg
◆ Funcții de cântărire	► numărare piese; ► cântărire simplă; ► cântărire procentuală; ► rețetă.
◆ Afișaj	cu cristale lichide
◆ Interfață	interfață universală Local CAN

Cântărirea la balanțele electronice trebuie să se realizeze numai în recipiente de sticlă sau metalice.

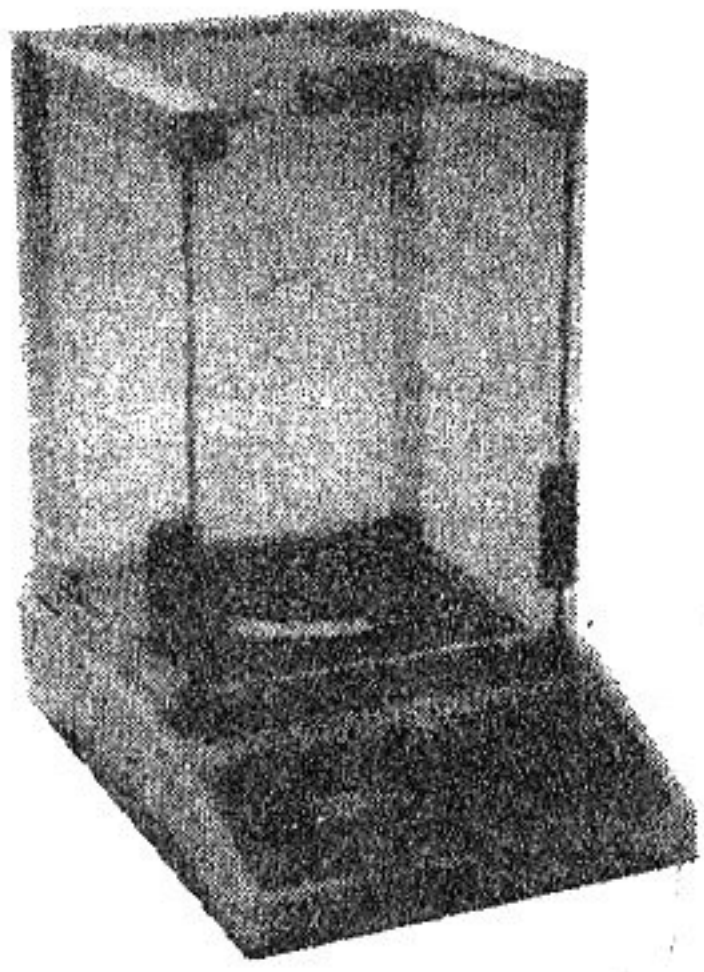
Pentru ca eroarea de cântărire să fie cât mai mică trebuie să se utilizeze recipiente de dimensiuni mici, cu gât îngust și acoperite.

I.5.1.3. DIZOLVAREA SUBSTANȚELOR

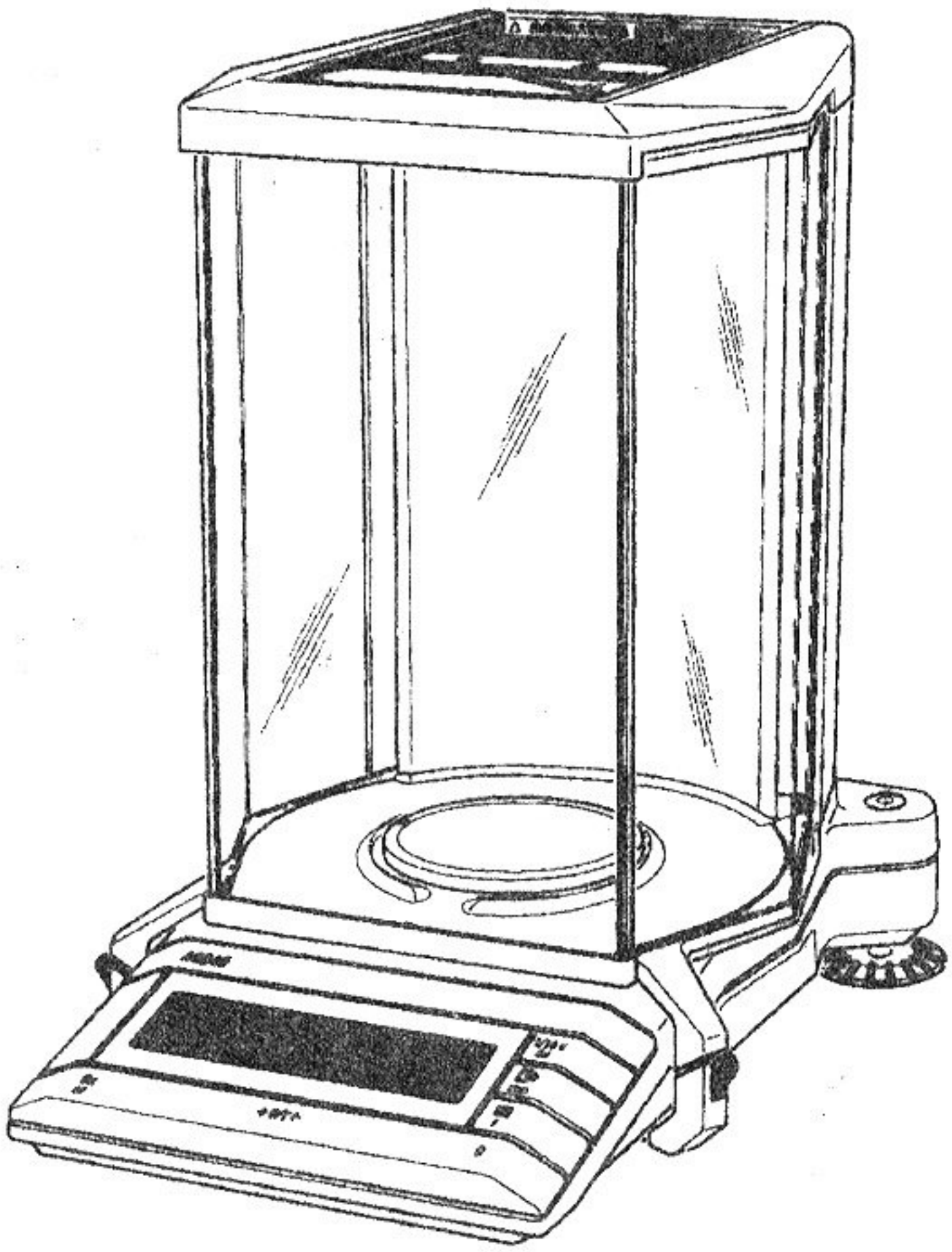
Transferul substanței din fiola de cântărire în vasul volumetric trebuie să se realizeze cantitativ, fără pierdere de substanță folosind apă distilată sau bidistilată și o spatulă curată.



KERN 870



KERN 960-477



KERN 430

Fig.I.1. **Tipuri de balanțe electronicc.**

Cantitățile mici de substanță rămasă pe sticla de ceas sau fiola de cântărire se antrenează cu ajutorul apei distilate dintr-o pisetă, prin intermediul unei pâlnii de sticlă într-un balon cotat, în cazul preparării soluțiilor etalon sau într-un cilindru gradat, în cazul preparării soluțiilor aproximative.

Dizolvarea se va face la temperatura pentru care este calibrat vasul volumetric respectiv, agitând continuu prin mișcări circulare sau cu o baghetă de sticlă până la completa dizolvare a substanței, aducând apoi la cotă cu apă distilată volumul soluției.

În cazul în care soluțiile necesită un pH anumit, el trebuie verificat cu hârtie indicator sau cu ajutorul unui pH-metru și, dacă este necesar, se va ajusta cu cantități mici de acid sau bază înainte de a aduce soluția la cota vasului volumetric.

Soluțiile astfel preparate se transvazează în sticle de reactivi adecvate, perfect curate, uscate și obligatoriu etichetate.

Dacă toate aceste deziderate sunt îndeplinite, precizia analizelor nu depinde decât de priceperea, atenția și conștiinciozitatea personalului de laborator.

I.5.2. ERORI ÎN PĂSTRAREA ȘI FOLOSIREA SOLUȚIILOR

În etapele premergătoare prelucrării probelor de laborator este posibil să apară anumite erori. Pentru evitarea acestora este necesar să ținem cont de o serie de observații, precizări și restricții.

Soluțiile se păstrează în flacoane de sticlă cu dop etanș. Pentru soluțiile care trebuie ferite de lumină se recomandă folosirea de sticle sau borcane brune.

Există soluții (hidroxizi) care trebuie să fie ferite de contactul cu aerul, pentru a evita **carbonatarea** lor prin absorbție de dioxid de carbon.

Pentru folosirea zilnică este necesar să se scoată din flaconul de reactivi **cantitatea aproximativ** necesară, calculată conform numărului de analize, evitând impurificarea soluției prin pipetări repetate și inutile.

În cazul substraturilor enzimatice se recomandă adăugarea preventivă de conservanți **antibacterieni**, în vederea evitării dezvoltării unor microorganisme și deci, contaminării bacteriene.

Folosirea unui **blanc** al reactivilor (martor) este obligatorie în orice tehnică de laborator și orice modificare în valoarea acestuia indică o alterare a soluțiilor utilizate.

Soluția **standard** trebuie verificată la fiecare serie de analize, deoarece orice schimbare a valorii standardului influențează valoarea probelor de analiză curentă.

Determinările de pH pot genera erori în cazul utilizării unei hârtii indicator păstrate în condiții improprii sau expirate.

În cazul utilizării pH-metrului, posibilitățile de eroare se multiplică și depind de utilizarea unor electrozi deveniți necorespunzători sau de folosirea incorectă a acestuia.

I.5.3. ERORI ÎN PRELUCRAREA PROBELOR

Odată cu prelucrarea de către personalul din laborator a produselor biologice, acestuia îi revine întreaga responsabilitate a executării analizelor, proces care începe de la modul de păstrare până la efectuarea propriu-zisă.

Orice probă biologică trebuie să fie însoțită de anumite date de identificare a pacientului, a diagnosticului clinic, ziua și ora recoltării, care se notează în condica de înregistrări.

Probele se numerotează înaintea prelucrării lor, având în vedere să nu se creeze confuzii care ar conduce la erori grave.

Se recomandă, ca după sosirea probelor de sânge, să se treacă la separarea hematiilor sau cheagului cât mai repede, deoarece unele substanțe, cum ar fi potasiul, difuzează din hematii în ~~plasmă~~, dacă acestea sunt ținute un timp îndelungat în contact.

Dacă probele se țin la o temperatură prea ridicată, acest lucru ar putea duce la denaturarea unor proteinenzime și deci la scăderea activității unor enzime ce urmează a fi determinate.

Unele substanțe, cum ar fi **bilirubina,** se oxidează la lumină, motiv pentru care, ca măsură de precauție, probele trebuie ferite de lumină și expunere la aer.

Păstrarea probelor de pe o zi pe alta nu este contraindicată, dar ele trebuie să fie acoperite cu leucoplast, evitând astfel evaporarea și posibilitatea contaminării lor bacteriene.

Determinările enzimatice trebuie efectuate într-un interval de timp limitat, iar neprelucrarea materialului în timpul prescris conduce la erori inevitabile.

Pentru studierea sedimentului în cadrul examenului sumar de urină este necesar ca centrifugarea și analiza microscopică a sedimentului să se facă în decurs de 30 de minute de la emisie.

În determinările activităților enzimatice există un **timp optim** de **incubare** care, dacă nu este respectat cu rigurozitate, poate duce la rezultate prea mari sau prea mici, în funcție de felul cum nu s-a ținut cont de această condiție.

Determinările colorimetrice necesită un **timp optim** pentru dezvoltarea maximă a culorii, iar când se depășește timpul indicat produsul de reacție se distruge, ducând la scăderea intensității culorii, fapt care falsifică rezultatele.

Când numărul probelor este mare, pentru evitarea erorilor este necesară cronometrarea adăugării reactivului de culoare, astfel ca toate probele, standardul și blancul să aibă același timp de dezvoltare a culorii.

Unele reacții sunt influențate de lumină în timpul incubării, ceea ce determină distrugerea parțială a produsului de reacție sau formarea mai multor produși de reacție; de aceea respectarea timpului de dezvoltare a culorii la întuneric este strict necesară.

Operația de filtrare, strict necesară în dozarea unor parametri biologici, poate duce la erori dacă se folosește un filtru neadecvat, dacă unele substanțe se absorb pe hârtie de filtru sau soluția filtrată este tulbure. Se recomandă refiltrarea prin aceeași hârtie de filtru care va funcționa ca un dublu filtru.

Filtrul care conține substanțe reducătoare conduce la erori în dozările care au la bază principiul reducerii (glucoza) și, de aceea se

recomandă folosirea hârtiei de filtru marca Schleider - Schüll sau Carlo Erba. Este necesar ca toate aceste recomandări să fie respectate pentru obținerea unor rezultate exacte.

În final, buletinul cu rezultatul analizelor va fi completat corect și va purta semnătura și parafa celui care a lucrat.

I.5.4. MĂSURAREA VOLUMELOR DE REACTIVI

Precizia rezultatelor analitice depinde de două operații importante: cântărirea și măsurarea volumelor de reactivi.

Măsurarea volumelor se realizează cu diferite tipuri de vase de sticlă, riguros gradate, respectiv etalonate: baloane cotate, cilindri gradați, pipete, biurete.

Baloanele cotate sunt vase de sticlă cu fund plat, gât alungit pe care se află marcat un semn circular numit **cotă**, care reprezintă limita până la care se umple balonul cu volumul pentru care a fost calibrat. Baloanele cotate au o gamă largă de capacități: 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 2000, 5000 cm^3 (ml) fiind prevăzute cu dopuri rodate și șlif.

Soluția din baloanele cotate trebuie să ajungă până la **cotă**, astfel încât meniscul lichidului să fie tangent la acest nivel.

Cilindrii gradați sunt vase cilindrice din sticlă gradate în cm^3, fiind utilizate pentru măsurători aproximative de volum. Cilindrii gradați au capacități cuprinse între 5 - 2000 cm^3.

Lichidele volatile se măsoară cu cilindri prevăzuți cu dop rodat, perfect etanș.

Pipetele sunt tuburi de sticlă efilate la partea inferioară, utilizate pentru măsurarea exactă a volumelor mici de soluție. Există trei tipuri de pipete:

- pipete cotate (cu bulă);
- pipete gradate (cu diviziuni);
- micropipete.

Pipetele cotate se caracterizează prin existența unor bule pe care sunt gravate volumul, temperatura de etalonare și a unui semn

circular (cotă). Cu ajutorul pipetelor cu bulă se pot măsura volume fixe de lichid și nu prezintă gradații intermediare.

Gama de capacități a pipetelor cu bulă este: 1, 2, 5, 10, 25, 50 și 100 cm^3 (ml).

Pipetele gradate sunt utilizate pentru măsurarea unor volume de soluție mai mici decât gradația maximă.

Pipetele gradate au capacități: 1, 2, 5, 10, 20, 25 cm^3 (ml).

Micropipetele sunt utilizate pentru prelevarea volumelor de soluție sub 100 µl (0,01- - 0,1 cm^3), folosite în microanaliza biochimică.

Indiferent de tipul pipetei, operația de măsurare a volumelor de reactiv (pipetarea) implică următoarele etape:

➢ pipeta se ține în mâna dreaptă, iar sticla de reactivi în mâna stângă;

➢ se imersează vârful pipetei în soluție și se aspiră până când lichidul depășește gradația dorită (cazul pipetelor gradate) sau semnul cotei superioare (cazul pipetelor cu bulă);

➢ se astupă capătul superior al pipetei cu degetul arătător;

➢ se ridică degetul și se lasă lichidul să curgă ușor până când meniscul ajunge tangent la cotă sau la diviziunea dorită; în acest moment se astupă imediat capul superior al pipetei cu degetul arătător;

➢ se șterge vârful pipetei cu hârtie de filtru și se aduce vârful pipetei pe peretele interior al vasului în care se va introduce volumul de lichid măsurat cu pipeta;

➢ se ridică degetul arătător și se lasă să se scurgă liber întregul volum de lichid din pipetă sau numai o parte din acesta, în funcție de volumul dorit a fi pipetat;

➢ măsurarea volumelor se face prin menținerea pipetei în poziție verticală (nu oblică!), iar citirea cotei (diviziunii) se face astfel ca tangenta la meniscul de lichid să fie situată la nivelul ochilor observatorului.

➢ ultimele picături se scurg prin încălzirea bulei sau mijlocului pipetei cu podul palmei și astupând capătul superior al pipetei;

➢ pipetele utilizate se spală, se clătesc cu apă distilată și apoi se introduc în stative speciale destinate acestui scop.

II. NOȚIUNI GENERALE DE ANALIZĂ CHIMICĂ

II.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Pentru cunoașterea cât mai profundă a materiei este necesară analiza chimică calitativă și cantitativă a substanțelor care o compun.

Chimia analitică reprezintă acea ramură a chimiei care are ca obiect de studiu stabilirea, prin metode corespunzătoare, a compoziției calitative și cantitative a substanțelor sau a amestecurilor de substanțe.

În funcție de scopul și obiectivele urmărite, chimia analitică se subdivide în:

- chimia analitică calitativă;
- chimia analitică cantitativă.

Analiza calitativă stabilește natura elementelor care compun o anumită substanță, respectiv precizarea compoziției sale calitative.

Analiza cantitativă stabilește raporturile cantitative în care se găsesc aceste elemente componente ale substanțelor.

Biochimia analitică stabilește prin metode adecvate naturii biomoleculelor și mediului biologic în care se găsesc, atât aspecte calitative, cât și cantitative.

Biochimia analitică cantitativă are ca arie de studiu stabilirea și evaluarea modificărilor biochimice la nivelul organismului uman, în condiții normale și patologice sau în corelație cu diferite tratamente.

Pentru dozarea diferitelor substanțe, chimia analitică utilizează anumite metode experimentale:

► **metode gravimetrice** - care se bazează pe transformarea unui element chimic sau a unei grupări de elemente dintr-o substanță, într-un produs practic insolubil, ce se izolează din soluție sub formă de precipitat; concentrația componentului care este complet inclus în precipitat se determină prin cântărirea acestuia, respectiv prin calcul și de aceea această metodă se numește gravimetrică;

► **metode volumetrice** - se bazează pe măsurarea exactă a volumului soluției unui anumit reactiv, de concentrație precis cunoscută, care reacționează cu substanța de analizat;

► **metode fizico - chimice** - care utilizează diverse aparate și instrumente bazate pe anumite principii fizice, în special metode **optice** și **electrochimice** de analiză.

Asupra metodelor fizico-chimice utilizate în biochimia clinică vom reveni într-un alt capitol consacrat.

II.2. ANALIZA VOLUMETRICĂ

II.2.1. BAZELE TEORETICE ALE ANALIZEI VOLUMETRICE

Prin analiză volumetrică se poate determina concentrația unei substanțe dintr-o soluție măsurând exact volumul unei soluții de reactiv de concentrație cunoscută (**soluție titrată**) care reacționează cantitativ cu substanța de dozat.

Dacă vom lua în considerare următoarea reacție generală:

aA + bB → cC + dD, în care:

A - reprezintă componentul a cărui concentrație urmează a fi determinată (componentul de dozat) dintr-un anumit volum bine precizat de soluție;

B - soluție de reactiv de concentrație cunoscută (soluție titrată) cu care componentul A reacționează cantitativ;

C și D - produși de reacție;

a, b, c, d - coeficienți stoechiometrici ai reacției.

Cantitatea de substanță A se poate determina prin adăugarea treptată a unor volume mici din soluția B (picături) de concentrație cunoscută, până în momentul în care întreaga cantitate de substanță A a reacționat cantitativ cu substanța B, deci până la atingerea **punctului de echivalență.**

Această operație de măsurare exactă a volumelor de soluție se numește **titrare** și se realizează cu ajutorul **biuretei**; prin calcul se determină cantitatea de substanță A supusă analizei.

Deoarece prin această metodă de analiză cantitativă se măsoară volume de soluție, denumirea metodei este aceea de analiză **volumetrică** sau **titrimetrică.**

Operația de **titrare** reprezintă procedeul prin care soluția de reactiv de concentrație cunoscută (soluție titrată) se adaugă picătură cu picătură, până la atingerea punctului de echivalență.

Punctul de echivalență reprezintă **sfârșitul titrării**, adică momentul în care toată cantitatea de substanță A din soluția de analizat a reacționat cu substanța B din soluția de concentrație cunoscută.

La punctul de echivalență, unele din proprietățile soluției suferă o modificare bruscă, care poate fi sesizată fie vizual, fie cu ajutorul unor instrumente care funcționează pe baza unor proprietăți fizico - chimice.

Deoarece variația proprietății considerate nu coincide exact cu sfârșitul titrării, punctul de echivalență în operația de titrare se stabilește cu o anumită eroare. În general, nu există o suprapunere perfectă între punctul de echivalență și punctul final al titrării.

Punctul final al titrării se poate sesiza prin următoarele metode:

- **metode vizuale** - utilizează anumite substanțe denumite indicatori chimici, care indică punctul final prin schimbarea unei anumite proprietăți a acestora ușor de sesizat (culoare, fluorescență, turbiditate);
- **metode fizico - chimice** - care măsoară cu ajutorul unui instrument adecvat o anumită mărime fizică, care la punctul final al titrării își schimbă brusc valoarea (titrare conductometrică, potențiometrică, spectrofotometrică, fluorimetrică, radiometrică).

II.2.2. CLASIFICAREA METODELOR DE ANALIZĂ VOLUMETRICĂ

Pentru ca o **reacție chimică** să fie utilizată în analiza volumetrică, trebuie să îndeplinească următoarele condiții stricte:

► să fie **stoechiometrică**, respectiv să fie exprimată printr-o ecuație chimică exactă, reactanții și produșii fiind în raporturi cantitative bine definite;

► să fie practic **totală**, respectiv să aibă loc o transformare cantitativă a reactanților;

► să fie **rapidă**, respectiv să se desfășoare într-un timp cât mai scurt, practic spontan;

► **sfârșitul** reacției să fie precizat printr-o schimbare bruscă a uneia din proprietățile fizice sau chimice ale substanței;

► soluția titrată și produșii de reacție nu trebuie să reacționeze cu alte substanțe prezente în soluția de analizat.

Îndeplinesc aceste condiții următoarele tipuri de reacții:

- reacții ionice de dublu schimb;
- reacții de neutralizare;
- reacții de precipitare;
- reacții de oxidare;
- reacții cu formare de combinații complexe.

Criteriul de clasificare a metodelor analizei volumetrice este acela al tipului de reacție utilizat în metoda respectivă:

I. Volumetria prin reacții de **neutralizare:**

◆ **acidimetria** - care utilizează o soluție de acid tare de concentrație bine cunoscută pentru dozarea bazelor tari, bazelor slabe și a sărurilor cu hidroliză bazică;

◆ **alcalimetria** - care utilizează o soluție de hidroxid tare de concentrație bine cunoscută pentru dozarea acizilor tari, acizilor slabi și a sărurilor cu hidroliză acidă.

II. Volumetria prin reacții de **precipitare**:

◆ **argentometria** - care folosește o soluție de azotat de argint pentru dozarea halogenurilor;

◆ **mercurimetria** - care utilizează soluții de săruri mercurice.

III. Volumetria prin reacții de **oxido - reducere**:

◆ **manganometria** - care folosește o soluție de permanganat de potasiu ($KMnO_4$) de concentrație exact cunoscută pentru dozarea substanțelor reducătoare;

◆ **iodometria** - care folosește ca oxidant o soluție de iod de concentrație exact cunoscută;

◆ **dicromatometria** - care folosește ca oxidant o soluție de dicromat de potasiu de concentrație exact cunoscută.

IV. Volumetria prin reacții cu formare de **combinații complexe**:

◆ **complexonometria** - care utilizează pentru dozarea unor substanțe formarea unor combinații complexe.

II.2.3. OPERAȚIA DE TITRARE. ERORI ÎNTÂLNITE ÎN TITRAREA SOLUȚIILOR

Titrarea este una din operațiile principale ale analizei volumetrice. Titrarea reprezintă adăugarea gradată - picătură cu picătură - a soluției de reactiv de concentrație cunoscută, peste soluția de analizat, până la punctul de echivalență. Volumul de reactiv utilizat la titrare se măsoară cu ajutorul biuretei.

Biuretele sunt vase gradate de sticlă care la partea inferioară au un dispozitiv cu ajutorul căruia se poate închide sau regla scurgerea soluției. Acest dispozitiv poate fi un tub de cauciuc prevăzut cu o clemă sau un robinet din sticlă care permite reglarea scurgerii lichidului din biuretă.

În cazul soluțiilor **alcaline** se folosesc **biuretele cu clemă**, iar în cazul soluțiilor **acide** sau **oxidante biuretele cu robinet**. Biuretele cu robinet se ung cu foarte puțină unsoare.

În funcție de capacitatea lor, biuretele sunt de mai multe feluri:

• **macrobiuretele** - cu capacități de 25, 50 și 100 cm^3, gradate în cm^3 și fracțiuni;

• **microbiuretele** - cu capacități de 1 cm^3 sau 2 cm^3, gradate în zecimi și sutimi de cm^3;

• **biurete cu umplere automată** - folosite în cazul determinărilor de serie mare.

Pentru măsurarea volumelor de soluție cu biureta trebuie respectate următoarele condiții:

◆ biureta se fixează în poziție verticală cu ajutorul unui stativ și al unei cleme;

◆ biureta se umple cu soluție pe la partea superioară (deschisă), astfel încât să fie depășită diviziunea zero sau altă gradație considerată;

◆ cu ajutorul clemei sau robinetului de sticlă se evacuează aerul din partea inferioară a biuretei;

◆ se lasă soluția să se scurgă prin picurare până când meniscul inferior al soluției devine tangent la diviziunea zero sau la altă diviziune considerată, în cazul soluțiilor incolore, iar pentru cele colorate, până când meniscul superior devine tangent la gradația respectivă;

◆ măsurarea volumelor cu ajutorul biuretei se face prin scurgerea soluției cu viteză mică, treptat și în picături, astfel încât erorile datorate aderenței soluției la pereții biuretei să fie minime.

La titrarea soluțiilor pot apărea următoarele erori:

I. **Eroarea de picurare.** În analiza volumetrică, soluției de analizat i se adaugă soluția titrată, până când ultima picătură produce o schimbare vizibilă a unei proprietăți a soluției (culoare, fluorescență, turbiditate).

Este foarte probabil, ca acest efect să fie produs de un exces de o picătură sau o fracțiune dintr-o picătură a reactivului volumetric.

Excesul de reactiv de o picătură constituie eroarea de picurare, care în cazul utilizării unor macrobiurete poate fi considerabilă.

Eroarea de picurare este cu atât mai mică, cu cât se lucrează cu volume mai mari de reactiv și cu biurete care la scurgere formează picături mai mici.

Dacă, de exemplu, volumul soluției cu care se titrează este **V** [ml], iar volumul picăturii este **v**, atunci eroarea de picurare **p**, va fi:

$$p = +\frac{100 \cdot v}{V}\%$$

Pentru V = 50 ml și v = 0,03 ml; p = + 0,06%, iar pentru

V = 25 ml și v = 0,03 ml; p = + 0,12%.

II. **Eroarea de scurgere.** La scurgerea unui lichid printr-un tub, volumul care aderă la suprafața interioară este funcție de tensiunea superficială, vâscozitatea, densitatea și viteza de scurgere.

Dacă acești factori sunt menținuți constanți, cantitatea de soluție care aderă va depinde de suprafața pe care o umezește acest volum.

Suprafața laterală S a cilindrului pe care-l ocupă un anumit volum V de soluție este:

$$S = \pi \cdot d \cdot h \qquad (1)$$

în care **h** este înălțimea coloanei de soluție, iar **d** este diametrul cilindrului. Volumul de soluție va fi:

$$V = \frac{h \cdot \pi \cdot d^2}{4} \qquad (2), \text{ de unde: } h = \frac{4 \cdot V}{\pi \cdot d^2} \qquad (3)$$

și înlocuind în formula (1) se obține: $S = \frac{4 \cdot V}{d}$ (4).

Valoarea suprafeței pentru un volum de 10 ml, în biurete cu diametrul diferit:

d (cm)	1	0,5	0,25
S (cm^2)	40	80	160

astfel încât volumul de lichid care aderă va fi cu atât mai mare, cu cât suprafața interioară este mai mare.

Din acest punct de vedere este mai potrivit să se lucreze deci cu biurete cu diametrul mai mare. Volumul de lichid care aderă la peretele interior al biuretei depinde foarte mult de durata de scurgere și scade mult cu creșterea acestei durate. De aceea, **titrarea** se va efectua într-un **ritm lent**, ca și la etalonarea biuretei. Eroarea de scurgere apare în cazul măsurării volumelor cu biureta, dar și cu pipeta.

III. **Eroarea de citire.** Relația între menisc și gradații, are o mare importanță în citirea volumelor de soluție.

Citirea gradației de pe biuretă se face într-o asemenea modalitate încât să fie înlăturată eroarea de paralaxă care se produce în cazul în care, la citirea gradației ochiul observatorului este situat deasupra sau sub orizontala tangentă la menisc (vezi fig.II.1.).

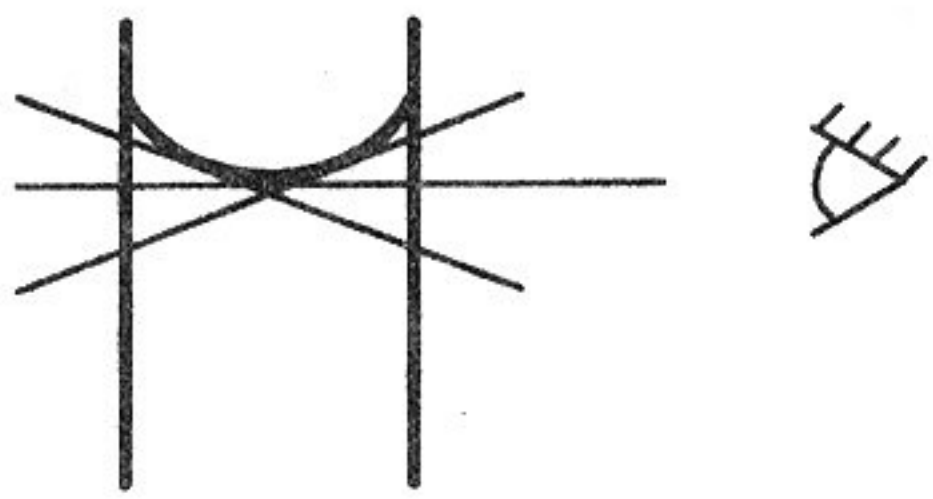


Fig.II.1. **Citirea corectă la biuretă sau pipetă.**

Cea de a doua eroare de citire se datorește fenomenelor de reflexie de la suprafața meniscului și de refracție a luminii la suprafața soluției. Pentru înlăturarea efectelor acestor fenomene optice, se folosește o bucată de carton înnegrit care se așează în spatele biuretei sub meniscul soluției.

Eroarea de citire va fi cu atât mai mică, cu cât diametrul interior al biuretei va fi mai mic, respectiv cu cât **h** va fi mai mare.

IV. **Eroarea de temperatură.** Toate ustensilele folosite pentru măsurarea volumelor de soluție (baloane cotate, pipete, biurete) sunt etalonate pentru o anumită temperatură, de obicei **20ºC** care este considerată ca fiind temperatura normală **convențională.**

Volumul soluțiilor se modifică în funcție de temperatura laboratorului unde sunt preparate. Dacă soluțiile se prepară la o temperatură diferită de 20ºC, apare eroarea de temperatură.

II.2.4. UNITĂȚI ȘI SUBUNITĂȚI UTILIZATE ÎN LABORATORUL CLINIC

Sistemul Internațional de Unități, prescurtat **SI**, este sistemul elaborat de Conferința Generală de Măsuri și Greutăți și adoptat de aproape toate țările industrializate din lume. El se bazează pe sistemul MKSA (metru - kilogram - secundă - amper).

Biochimia analitică operează cu anumite **unități**, respectiv **subunități** prin care se exprimă masa substanțelor sau volumul reactivilor la care se raportează o anumită analiză.

TABELUL II.1. UNITĂȚI ȘI SUBUNITĂȚI DE MASĂ.

Denumirea unității	Simbol	Exprimare
gram	g	$1 \cdot 10^{-3}$ Kg
miligram	mg	$1 \cdot 10^{-3}$ g
microgram	μg	$1 \cdot 10^{-6}$ g = $1 \cdot 10^{-3}$ mg
nanogram	ng	$1 \cdot 10^{-6}$ mg = $1 \cdot 10^{-3}$ μg
picogram	pg	$1 \cdot 10^{-12}$ g = $1 \cdot 10^{-6}$ μg = $1 \cdot 10^{-3}$ ng

Conform Sistemului Internațional de Unități (SI), ca unitate de masă se consideră kilogramul (Kg), iar ca unitate de volum metrul cub (m^3).

TABELUL II.2. UNITĂȚI ȘI SUBUNITĂȚI DE VOLUM.

Denumirea unității	Simbol	Exprimare
litru	l	$1 \cdot 10^{-3}$ m^3
mililitru	ml (cm^3)	$1 \cdot 10^{-3}$ l
microlitru	μl	$1 \cdot 10^{-6}$ l = $1 \cdot 10^{-3}$ cm^3
nanolitru	nl	$1 \cdot 10^{-9}$ l = $1 \cdot 10^{-6}$ cm^3 = $1 \cdot 10^{-3}$ μl
picolitru	pl	$1 \cdot 10^{-12}$ l = $1 \cdot 10^{-9}$ cm^{-3} = $1 \cdot 10^{-6}$ μl = $1 \cdot 10^{-3}$ nl

În tabelele II.1. și II.2. sunt prezentate unitățile și subunitățile de masă și volum (după Radu Mihai Vasile).

TABELUL II.3. UNITĂȚI ȘI SUBUNITĂȚI SUPLIMENTARE.

Denumirea unității	Simbol	Valoarea în unități SI
minut	min	1 min = 60 s
oră	h	1 h = 60 min = 3600 s
zi	d	1 d = 24 h = 86400 s
litru	l	1 l = 1 dm^3 = 10^{-3} m^3
tonă	t	1 t = 10^3 Kg

II.2.5. MĂRIMI UTILIZATE ÎN VOLUMETRIE

Metodele chimice pentru identificarea sau dozarea unui anumit component dintr-un amestec necesită prepararea anumitor soluții de referință care să reacționeze cu compusul respectiv și ale căror concentrații să fie perfect cunoscute.

În analiza volumetrică trebuie cunoscută cu exactitate concentrația reactivilor folosiți, deoarece pe baza volumului de reactiv utilizat se stabilește, prin calcul, concentrația componentului de dozat.

Soluțiile de reactiv de concentrație precis determinată utilizate în volumetrie sunt denumite **soluții titrate.**

Pentru prepararea soluțiilor titrate este necesară cunoașterea semnificației analitice și operaționale a unor noțiuni, cum ar fi: **masa atomică, atom gram, masă moleculară, moleculă gram, echivalent chimic, echivalent gram.**

Masa atomică este un număr care precizează de câte ori atomul unui element chimic este mai greu decât unitatea de masă atomică. Unitatea de masă atomică (UMA) reprezintă 1/12 din masa atomului de carbon (^{12}C).

Atomul gram reprezintă cantitatea, exprimată în grame, dintr-un element chimic, numeric egală cu masa sa atomică.

TABELUL II.4. EXEMPLE DE ATOMI GRAM.

Elementul	Simbolul	Masa atomică	Atomul gram (g)
Argint	Ag	107,86	107,86
Brom	Br	79,909	79,9
Carbon	C	12,01	12,01
Clor	Cl	35,453	35,453
Fosfor	P	30,97	30,97
Magneziu	Mg	24,33	24,33
Sodiu	Na	22,98	22,98

Masa moleculară este un număr care indică de câte ori molecula unei substanțe este mai grea decât unitatea de masă atomică. Masele moleculare ale diferitelor substanțe pot fi obținute prin simpla însumare a maselor atomice ale atomilor ce alcătuiesc moleculele respective.

TABELUL II.5. **EXEMPLE DE MOLECULE GRAM.**

Substanța	Formula moleculară	Masa moleculară	Molecula gram (g)
Hidrogen	H_2	2,016	2,016
Azotat de argint	$AgNO_3$	169,9	169,09
Carbonat de sodiu anhidru	Na_2CO_3	106	106
Acid sulfuric	H_2SO_4	98,075	98,075
Clorură de sodiu	NaCl	58,45	58,45
Hidroxid de sodiu	NaOH	40,01	40,01
Acid clorhidric	HCl	36,465	36,465

Molecula gram reprezintă cantitatea, exprimată în grame, dintr-un compus chimic numeric egală cu masa sa moleculară (mol gram).

Echivalentul chimic (E) reprezintă un număr care arată câte părți dintr-un element sau compus chimic se combină, înlocuiesc sau pun în libertate 1,008 părți de hidrogen sau 8 părți de oxigen.

Echivalentul gram (**val**) reprezintă cantitatea, exprimată în grame, dintr-un element sau combinație chimică, care se combină sau înlocuiește un atom gram de hidrogen (1,008 g H_2) sau un atom gram de oxigen (8 g O_2). Echivalentul gram este echivalentul chimic exprimat în grame.

Miliechivalentul (**mE**) reprezintă a mia parte (1/1000) din echivalentul chimic:

$$mE = E \cdot 10^{-3}$$

Miliechivalentul gram (milival) reprezintă miliechivalentul chimic, exprimat în grame.

➢ II.2.5.1. CALCULUL ECHIVALENTULUI GRAM

Echivalentul chimic al unui element sau compus se calculează în funcție de natura reacției chimice la care acesta participă.

A **Reacții ionice**

◆ echivalentul chimic al elementelor se calculează împărțind masa atomică a elementului (A) la valența sa (V).

$$E = \frac{A}{V} \qquad (1)$$

◆ echivalentul gram al **acizilor** se calculează împărțind masa moleculară (M) a acidului la numărul de atomi de hidrogen din moleculă care pot disocia și care participă la reacția respectivă (atomi de hidrogen activi):

$$E = \frac{M}{nH^+} \qquad (2)$$

TABELUL II.6. ECHIVALENTUL CHIMIC AL UNOR ELEMENTE.

Elementul	Simbol	Masa atomică (A)	Valența	Echivalent chimic
Argint	Ag	107,86	1	107,86
Brom	Br	79,9	1	79,9
Calciu	Ca	40,08	2	20,04
Fosfor	P	30,97	3	10,32
Iod	I	126,9	1	126,9
Oxigen	O	15,99	2	7,99
Potasiu	K	39,1	1	39,1
Sodiu	Na	22,98	1	22,98
Sulf	S	32,06	2	16,03

TABELUL II.7. ECHIVALENTUL CHIMIC AL UNOR ACIZI.

Acidul	Formula	Masa moleculară	Număr de atomi de H activi	Echivalent chimic
Acid clorhidric	HCl	36,465	1	36,465
Acid sulfuric	H_2SO_4	98	2	49
Acid fosforic prima treaptă de disociere	H_3PO_4 $H_2PO^-_4$	97,998	1	97,998
Acid fosforic a doua treaptă de disociere	H_3PO_4 HPO^{2-}_4	97,998	2	48,999
Acid fosforic a treia treaptă de disociere	H_3PO_4 PO^{3-}_4	97,998	3	32,662

◆ **echivalentul chimic al bazelor** se calculează împărțind masa moleculară (M) a bazei la numărul de grupări hidroxil (- OH) din moleculă care iau parte la reacția respectivă.

$$E_{bază} = \frac{M}{nHO^-} \qquad (3)$$

TABELUL II.8. ECHIVALENTUL CHIMIC AL UNOR BAZE.

Baza	Formula	Masa moleculară	Număr de grupări -OH	Echivalent chimic
Hidroxid de potasiu	KOH	56,11	1	56,11
Hidroxid de sodiu	$NaOH$	40,01	1	40,01
Hidroxid de calciu	$Ca(OH)_2$	74	2	37
Hidroxid de aluminiu	$Al(OH)_3$	78	3	26

◆ **echivalentul chimic al sărurilor** se calculează împărțind masa moleculară (M) a sării la produsul obținut prin înmulțirea valenței (V) metalului (cationului) cu numărul de atomi ai metalului (Me):

$$E = \frac{M}{nMe \cdot V} \qquad (4)$$

TABELUL II.9. ECHIVALENTUL CHIMIC AL UNOR SĂRURI.

Sarea	Formula	Masa moleculară	Numărul de atomi de metal	Valență	Echivalent chimic
Azotat de argint	$AgNO_3$	169,9	1	1	169,9
Carbonat de sodiu anhidru	Na_2CO_3	106	2	1	53
Clorură de potasiu	KCl	74,55	1	1	74,55
Carbonat de magneziu	$MgCO_3$	84,3	1	2	42,15
Clorură de sodiu	NaCl	58,45	1	1	58,45
Sulfat feric	$Fe_2(SO_4)_3$	399,9	2	3 .	66,66
Sulfat feros	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	273,01	1	2	136,505
Sulfat de cupru	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249,8	1	2	124,9

B. **Calcularea echivalentului chimic (E) în reacții de oxido - reducere**

În reacțiile de oxido - reducere care decurg cu schimb de electroni, echivalentul chimic se calculează împărțind masa atomică (A) sau masa moleculară (M) la numărul de electroni cedați sau primiți de componentul respectiv în reacția de tip redox.

Echivalentul gram reprezintă cantitatea de substanță care reacționează cu un electron - gram în reacția respectivă.

Permanganatul de potasiu se comportă în mod diferit, în funcție de mediul în care se desfășoară reacția redox.

În tabelul II.10. sunt prezentate reacțiile redox în care participă $KMnO_4$ (M = 158,03).

TABELUL II.10. **ECHIVALENTUL CHIMIC AL $KMnO_4$.**

Condiții	Reacția		Nr. electroni	Echivalent chimic
◆ mediu **acid** schimb electronic	$2\ KMnO_4 + 3\ H_2SO_4 \rightarrow$ $\rightarrow 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 3H_2O + 5O$ $Mn^{7+} + 5\ e^- \rightarrow Mn^{2+}$ $O^{2-} - 2\ e^- \rightarrow O^\circ$	**2** **5**	5 e^-	158,03 5 **31,66**
◆ mediu **bazic** schimb electronic	$2\ KMnO_4 + 2\ KOH \rightarrow$ $\rightarrow 2\ K_2MnO_4 + H_2O + O$ $Mn^{7+} + 1\ e^- \rightarrow Mn^{6+}$ $O^{2-} - 2\ e^- \rightarrow O^\circ$	**2** **1**	1 e^-	158,03 1 **158,03**
◆ mediu **neutru** schimb electronic	$2\ KMnO_4 + 2\ H_2O \rightarrow$ $\rightarrow 2\ MnO_2 + 2\ KOH + 3\ O$ $Mn^{7+} + 3\ e^- \rightarrow Mn^{4+}$ $O^{2-} - 2\ e^- \rightarrow O^\circ$	**2** **3**	3 e^-	158,03 3 **52,67**

II.2.6. CONCENTRAȚIA SOLUȚIILOR

Amestecurile macroscopice **omogene** formate din două sau mai multe substanțe (solide, lichide sau gazoase) care nu interacționează chimic și alcătuiesc o singură fază **definesc soluțiile.**

Soluțiile pot fi de trei tipuri: gazoase, lichide și solide. În chimia analitică se folosesc curent soluțiile lichide.

O soluție lichidă este un sistem **binar** format din **dizolvant** și una sau mai multe substanțe dizolvate (**solvați**).

În cazul unui sistem binar, situație în care se încadrează majoritatea soluțiilor utilizate, concentrația poate fi exprimată prin cantitatea de substanță dizolvată într-un anumit volum sau masă de soluție. Cantitatea de substanță dizolvată poate fi raportată și la un anumit volum sau masă de solvent.

Modurile diferite de exprimare a concentrației corespund unei anumite necesități practice.

Cele mai utilizare modalități de exprimare a concentrației sunt:

◆ concentrația molară sau **molaritate**;

- concentrația molală sau **molalitate;**
- concentrația normală sau **normalitate;**
- concentrația procentuală sau **empirică.**

II.2.6.1. CONCENTRAȚIA MOLARĂ

Soluțiile care conțin dizolvat la 1000 ml (cm^3) soluție un mol gram, un multiplu întreg sau zecimal al molului gram dintr-o substanță, se numesc **soluții molare.**

Soluțiile a căror concentrație se exprimă prin molaritate se numesc **soluții molare** și se notează cu simbolul **m** sau **M** care însoțește cifra ce indică concentrația respectivă.

Cunoscând masa de substanță exprimată în grame (G) dizolvată în 1000 ml și masa moleculară (M) a substanțelor dizolvate se poate calcula molaritatea unei soluții (m):

$$m = \frac{G}{M}\ mol/l$$

În tabelul II.11. sunt prezentate câteva exemple de soluții molare.

TABELUL II.11. DEFINIȚIA UNOR SOLUȚII MOLARE.

Substanța	Formula	Masa moleculară	Concentrația molară	g substanță la litru
Hidroxid de sodiu	NaOH	40,005	1 m	40,005
Hidroxid de sodiu	NaOH	40,005	2 m	80,019
Hidroxid de sodiu	NaOH	40,005	3 m	120,015
Hidroxid de sodiu	NaOH	40,005	0,1 m	4,0005
Acid sulfuric	H_2SO_4	98,075	1 m	98,075
Acid sulfuric	H_2SO_4	98,075	2 m	196,15
Acid sulfuric	H_2SO_4	98,075	0,1 m	9,8075
Acid oxalic	$C_2O_4H_2 \cdot 2H_2O$	126,068	1 m	126,068
Acid oxalic	$C_2O_4H_2 \cdot 2H_2O$	126,068	0,1 m	12,6068

II.2.6.2. CONCENTRAȚIA NORMALĂ

Soluțiile care conțin dizolvat într-un litru (1000 cm^3) de soluție un echivalent gram (val) sau un multiplu întreg sau zecimal al echivalentului gram dintr-o substanță se numesc **soluții normale**. Soluțiile normale se notează cu simbolul **n** sau **N** ce însoțește cifra care indică concentrația respectivă.

Normalitatea unei soluții se poate calcula dacă se cunoaște cantitatea G, exprimată în grame, dizolvată într-un litru de soluție:

$$n = \frac{G}{E},$$

în care E reprezintă echivalentul gram al substanței dizolvate.

TABELUL II.12. **DEFINIREA UNOR SOLUȚII DE DIVERSE NORMALITĂȚI**

Substanța	Formula moleculară	M	Echivalent gram	Normalitate	g substanță dizolvată în 1 l soluție
Hidroxid de potasiu	KOH	56,11	56,11	1 n	1 x 56,11 = 56,11
Hidroxid de potasiu	KOH	56,11	56,11	0,1 n	0,1 x 56,11 = 5,611
Acid sulfuric	H_2SO_4	98,08	49,04	1 n	1 x 49 = 49
Acid sulfuric	H_2SO_4	98,08	49,04	0,1 n	0,1 x 49 = 4,9
Acid oxalic	$C_2O_4H_2 \cdot 2H_2O$	126	63	1 n	1 x 63 = 63
Acid oxalic	$C_2O_4H_2 \cdot 2H_2O$	126	63	0,1 n	0,1 x 63 = 6,3
Carbonat de sodiu	Na_2CO_3	106	53	1 n	1 x 53 = 53
Carbonat de sodiu	Na_2CO_3	106	53	0,1 n	0,1 x 53 = 5,3

Pentru a prepara o soluție de o anumită normalitate, cantitatea de substanță necesară, exprimată în grame (G), se calculează înmulțind echivalentul gram (E) cu normalitatea (n):

$$G = E \cdot n \qquad (1)$$

Atunci când este cunoscută normalitatea unei soluții, se poate trece ușor la prepararea unui volum dorit de o normalitate inferioară după formula:

$$N_1 V_1 = N_2 V_2 \qquad (2)$$

$$V_1 = \frac{N_2 \cdot V_2}{N_1} \qquad (3), \text{ în care:}$$

N_1 = normalitatea soluției cunoscute;
N_2 = normalitatea soluției cerute;
V_1 = volumul soluției cunoscute;
V_2 = volumul soluției cerute.

II.2.6.3. CONCENTRAȚIA PROCENTUALĂ

Soluțiile care conțin o anumită cantitate de substanță în 100 g sau 100 ml soluție se numesc **soluții procentuale**.

Se disting mai multe tipuri:

► **concentrația procentuală de volum (C% G/V)** care reprezintă cantitatea de substanță exprimată în grame dizolvată în 100 cm^3 soluție.

Exemplu: o soluție de NaOH 4% (G/V) conține 4 g NaOH dizolvate în 100 cm^3 soluție.

► **concentrația procentuală de volum (C% V/V)** se folosește în cazul dizolvării substanțelor lichide sau gazoase și reprezintă numărul de cm^3 de substanță dizolvată în 100 cm^3 soluție.

Exemplu: o soluție de alcool etilic 10% (V/V) conține 10 cm^3 alcool etilic în 100 cm^3 soluție.

► **concentrația procentuală de masă** (**C% G/G**) care reprezintă cantitatea de substanță exprimată în grame dizolvată în 100 g soluție.

Exemplu: serul fiziologic este o soluție de clorură de sodiu 0,9 g la 100 g soluție.

II.2.6.4. TITRUL SOLUȚIILOR

Analiza volumetrică utilizează **soluții titrate,** respectiv soluții de concentrație riguros cunoscută.

Prin **titrul** unei soluții se înțelege cantitatea de substanță, exprimată în grame, care se găsește dizolvată într-un ml (cm^3) de soluție.

Titrul unei soluții se notează cu T, iar soluția al cărei titru este cunoscut se numește **soluție titrată**.

Conform definiției titrului (T), rezultă următoarea relație:

$$T = \frac{G}{1000} = \frac{m \cdot M}{1000} = \frac{n \cdot E}{1000} \qquad (1), \text{ în care:}$$

G = cantitatea de substanță exprimată în grame dizolvată în 1000 cm^3 de soluție;

m = molaritatea soluției;

M = masa moleculară a substanței;

n = normalitatea soluției;

E = echivalentul gram al substanței dizolvate;

T = titrul calculat sau titrul teoretic (T_t).

Deoarece $\frac{E}{1000} = mE$ = miliechivalent gram (2);

înlocuind în relația (1), rezultă:

$$T_t = n \cdot mE \qquad (3)$$

Așadar, titrul unei soluții de normalitate exactă se calculează înmulțind miliechivalentul substanței dizolvate (mE) cu normalitatea sa (n).

Din relația (1) se poate calcula molaritatea și normalitatea soluției:

$$G = mM = nE = 1000\ T \qquad (4)$$

$$m = \frac{G}{M} = \frac{1000\ T}{M} \qquad (5)$$

$$n = \frac{G}{E} = \frac{1000\ T}{E} \qquad (6)$$

Pentru prepararea unei soluții cu un anumit titru se procedează, în general, după două metode:

- prin cântărirea unei anumite cantități din substanța respectivă care trebuie să îndeplinească condițiile unei substanțe **etalon**, dizolvând-o într-un balon cotat și diluând cu apă distilată până la cotă. Deoarece la majoritatea substanțelor dizolvarea este însoțită de consum sau degajare de căldură, dizolvarea și diluarea se realizează treptat, până când soluția din balon capătă temperatura laboratorului.
- prin titrarea cu ajutorul unei substanțe etalon, după una din metodele cunoscute.

Pentru aceasta se cântărește la balanța analitică (deci cu o precizie de patru zecimale) 0,15 - 0,20 g din substanța etalon, se dizolvă în apă și se titrează cu soluția al cărei titru urmează să se determine.

II.2.6.5. SUBSTANȚE ETALON SAU TITRIMETRICE

Substanțele etalon sau titrimetrice sunt acele substanțe din care prin simplă cântărire și dizolvare în balon cotat, urmată de completare la semn cu apă distilată, se pot obține soluții care au titrul egal cu cel teoretic.

Cele mai importante substanțe etalon primare sunt prezentate în tabelul II.13.

TABELUL II.13. **SUBSTANȚE ETALON PRIMARE ȘI CARACTERISTICILE ACESTORA.**

Substanța	Formula	M	Echivalent gram	Utilizat în
Azotat de argint	$AgNO_3$	169,9	169,9	dozarea halogenurilor
Bromat de potasiu	$KBrO_3$	166,97	27,83	bromatometrie
Dicromat de potasiu	$K_2Cr_2O_7$	294,12	49,02	dicromatometrie
Iodat de potasiu	KIO_3 (5 e^-)	213,97	42,794	iodatometrie
Iodat de potasiu	KIO_3 (6 e^-)	213,97	35,661	iodatometrie
Sare Mohr	$FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6\,H_2O$	392	392	permanganometrie
Clorura de sodiu	NaCl	58,5	58,5	dozarea Ag
Clorura de potasiu	KCl	74,56	74,56	dozarea Ag
Acid benzoic	C_6H_5 - COOH	122	122	stabilirea titrului KOH
Acid oxalic	$(COOH)_2 \cdot 2\,H_2O$	126	63	stabilirea titrului KOH
Carbonat de sodiu	Na_2CO_3	106	53	stabilirea titrului HCl
Boraxul	$Na_2B_4O_7 \cdot 10\,H_2O$	381,053	190,53	stabilirea titrului HCl

Substanțele etalon trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

◆ să fie foarte pure și să se poată obține ușor în starea de puritate necesară;

- să aibă o compoziție bine determinată și o formulă bine definită;
- să fie stabile în condițiile de lucru, adică să nu sufere procese de carbonatare, deshidratare, hidratare, oxidare, reducere;
- să fie suficient de stabile în solventul care se utilizează (de cele mai multe ori apa);
- să reacționeze cu alte substanțe după ecuații simple și bine definite;
- să aibă masă moleculară, respectiv echivalentul gram, relativ mare, astfel încât eroarea de cântărire să fie cât mai mică.

Pentru stabilirea titrului soluțiilor care se vor folosi ulterior pentru diferite determinări volumetrice se utilizează **soluții etalon** sau **standarde secundare.**

Soluțiile de HCl constituie un etalon (standard) secundar, deoarece concentrația lor exactă (titrul) se stabilește cu ajutorul unor soluții etalon primare de carbonat de sodiu (Na_2CO_3) sau borax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$).

Soluțiile de NaOH sau KOH constituie soluții etalon (standard) secundare, deoarece concentrația lor exactă se stabilește cu ajutorul unor soluții etalon primare de acid oxalic sau acid benzoic.

II.2.6.6. SOLUȚII REALE. FACTORUL DE CORECȚIE

Deoarece o serie de condiții îngrădesc posibilitatea unei substanțe de a avea calitatea de a fi etalon primar, numărul acestora e foarte restrâns.

Marea majoritate a substanțelor sunt folosite pentru prepararea unor soluții care **nu** au o concentrație exactă și se numesc **soluții aproximative**. Soluțiile aproximative sau reale au un titru real (T_r) diferit de titrul teoretic (T_t).

Cantitatea, în grame, de substanță dizolvată în 1 cm^3 de soluție aproximativă poartă denumirea de titru real (T_r) care este diferit, dar apropiat valoric de titrul teoretic (T_t).

Câteva **soluții aproximative uzuale** sunt menționate în cele ce urmează: soluții de acid clorhidric, acid sulfuric, hidroxid de sodiu, hidroxid de potasiu, permanganat de potasiu, iod, tiosulfat de sodiu etc.

Soluțiile aproximative pot fi folosite în analiza volumetrică la fel ca și soluțiile etalon primare, după ce, în prealabil, au fost **standardizate.**

Prin operația de standardizare se stabilește titrul real al acestor soluții, după determinarea experimentală a **factorului de corecție.**

Factorul de corecție reprezintă o valoare numerică cu ajutorul căreia se poate transforma un volum de soluție aproximativă într-un volum de soluție exactă.

Factorul de corecție (notat cu simbolul **F** sau **f**) reprezintă numărul de cm^3 de soluție de normalitate exactă care corespunde la 1 cm^3 de soluție aproximativă.

Factorul de corecție reprezintă raportul dintre titrul real și titrul teoretic.

$$F = \frac{T_r}{T_t} \qquad (1)$$

În cazul soluțiilor etalon al căror titru real este egal cu cel teoretic, factorul de corecție este 1,0000.

Factorul de corecție al unei soluții aproximative se determină experimental prin operație de **titrare**.

Factorul de corecție este important deoarece poate fi utilizat pentru:

- transformarea unui volum de soluție de concentrație aproximativă (V_r) într-un volum de soluție de concentrație exactă (V_e) folosind relația:

$$V_e = F \cdot V_r \qquad (2)$$

- calcularea titrului real (T_r) sau a concentrației reale a unei soluții aproximative pe baza relației:

$$T_r = F \cdot T_t \qquad (3)$$

Din legea echivalenților chimici aplicată la cazul a două soluții, o soluție **etalon** și o soluție **reală** de aceeași concentrație, va rezulta următoarea relație:

$$V_r \cdot F = V_e \cdot F_e \qquad (4)$$

În cazul în care $V_e = V_r$, factorul de corecție F = 1,0000.

Factorul de corecție este un număr calculat cu patru zecimale, mai mic sau mai mare în raport cu cifra **1**.

Pentru dozările volumetrice cu soluții aproximative este indicat ca factorul de corecție să aibă valori cuprinse între limitele **0,9000 - 1,1000**:

► dacă F > 1,0000, soluția aproximativă este mai concentrată decât soluția etalon;

► dacă F < 1,0000, soluția aproximativă este mai diluată decât soluția etalon, iar titrul său real este mai mic decât cel teoretic.

II.2.6.7. REGULA AMESTECURILOR

În mod frecvent, în laborator este necesară pregătirea unor soluții de concentrație diferită de a celor pe care le avem la dispoziție.

Calculul proporțiilor în care se amestecă două soluții pentru a rezulta o a treia de concentrație dorită se face cu ajutorul reguiii amestecurilor. Regula amestecurilor poate fi enunțată astfel:

Cantitățile de soluție care se amestecă sunt invers proporționale cu valorile absolute ale diferențelor dintre concentrațiile lor și concentrația soluției finale.

Pentru prepararea unei soluții **C** de concentrație **c**, din două soluții **A** de concentrație **a** și **B** de concentrație **b**, se amestecă din soluțiile **A** și **B** cantitățile m_A și m_B, exprimate în grame (în cazul soluțiilor procentuale) sau în litri (în cazul soluțiilor molare sau normale). Se pot scrie următoarele egalități:

$$\mathbf{a \cdot m_A + b \cdot m_B = c \cdot (m_A + m_B)} \qquad (1)$$

$$\mathbf{a \cdot m_A - c \cdot m_A = c \cdot m_B - b \cdot m_B} \qquad (2)$$

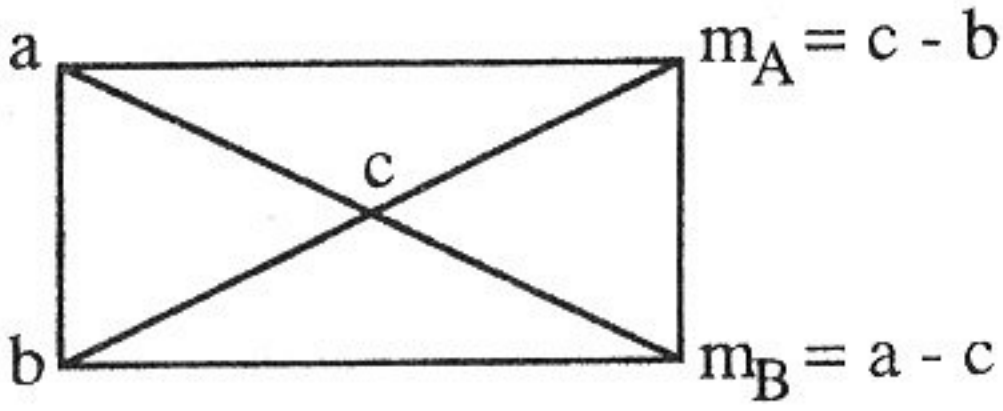
$$\mathbf{m_A \cdot (a - c) = m_B \cdot (c - b)} \qquad (3)$$

de unde rezultă relația matematică a regulii amestecurilor:

$$\frac{m_A}{m_B} = \frac{c-b}{a-c} \qquad (4)$$

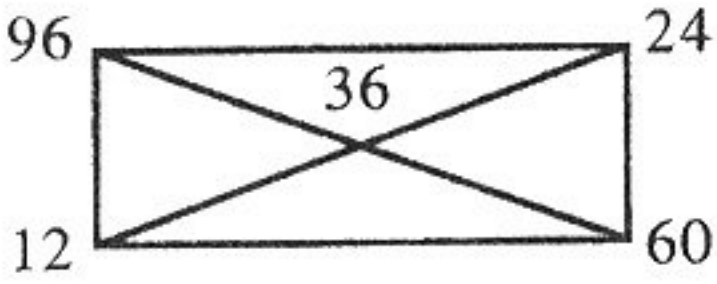
Reprezentarea grafică a relației de mai sus este realizată cu ajutorul „**regulii dreptunghiului**".

Se construiește un dreptunghi și se trasează cele două diagonale; la vârfurile din stânga se înregistrează cifrele reprezentând concentrațiile soluțiilor inițiale (concentrația mare sus, iar cea mică jos). La **intersecția** celor două diagonale se va înregistra **concentrația dorită**, iar în vârfurile din **dreapta** sunt înregistrate cantitățile de soluții ce se amestecă.



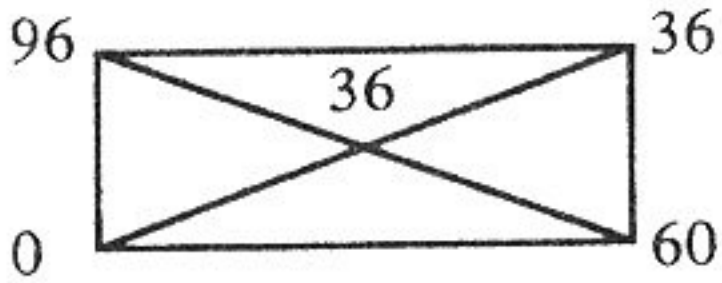
Exemple:

► pentru a obține o soluție de alcool etilic 36% folosind soluții de 96% și 12% se folosesc:



$$\frac{m_A}{m_B} = \frac{24}{60} = \frac{2 \text{ părți } 96\%}{5 \text{ părți } 12\%}$$

► dacă diluarea se face cu apă distilată, în locul concentrației mici se trece cifra 0; pentru cazul în care se cere să se obțină alcool etilic 36% prin diluarea alcoolului etilic 96% vom avea:



$$\frac{m_A}{m_B} = \frac{36}{60} = \frac{3 \text{ părți } 96\%}{5 \text{ părți } H_2O}$$

II.3. VOLUMETRIA PRIN REACȚII DE NEUTRALIZARE

Reacțiile de neutralizare sunt reacții cu transfer de protoni, utilizate pentru determinarea cantitativă a acizilor folosind ca reactiv de titrare o bază (**alcalimetria**) sau pentru determinarea cantitativă a bazelor folosind ca reactiv de titrare un acid (**acidimetria**).

Cazul general al unei reacții de neutralizare este:

$$\underset{\text{acid}}{(H^+ + A^-)} + \underset{\text{bază}}{(B^+ + HO^-)} \rightarrow \underset{\text{sare}}{(B^+ + A^-)} + H_2O$$

Pentru stabilirea punctului de echivalență în reacțiile de neutralizare sunt utilizați indicatori de pH acido - bazici.

Indicatorii acido - bazici sunt coloranți organici care pot să-și modifice culoarea în funcție de pH-ul mediului de reacție.

II.3.1. ALCALIMETRIA

Alcalimetria este metoda volumetrică prin care se dozează acizi tari, acizi slabi și săruri cu hidroliză acidă prin neutralizare cu un volum determinat dintr-o soluție titrată de bază (NaOH sau KOH).

Prin urmare, metodele **alcalimetrice** necesită prepararea unor soluții de NaOH sau KOH de o anumită normalitate.

Soluțiile de hidroxizi sunt aproximative, deoarece nu îndeplinesc condițiile de substanțe etalon și, pentru a putea fi utilizate, este necesar să li se stabilească factorul de corecție cu ajutorul unor soluții titrate de acizi.

II.3.1.1. PREPARAREA UNEI SOLUȚII APROXIMATIVE DE NAOH 0,1 N

Hidroxizii nu îndeplinesc condițiile de substanțe etalon, deoarece absorb dioxidul de carbon din atmosferă și se carbonatează la suprafață; totodată sunt substanțe higroscopice, adică absorb vaporii de

apă din atmosferă. Din aceste motive hidroxizii pot fi utilizați numai pentru obținerea de soluții aproximative.

În principiu, pentru a prepara un anumit volum (V) de soluție aproximativă de NaOH 0,1 n, se procedează astfel:

➢ se calculează echivalentul gram al NaOH:

$$E_{NaOH} = \frac{40}{1} = 40\ g$$

➢ cantitatea teoretică de NaOH ce trebuie cântărită și dizolvată în volumul V de soluție (exprimat în litri) rezultă din relația:

$$G = E \cdot n \cdot V$$

➢ pentru volumul (V) de un **litru**, cantitatea de NaOH necesară este:

$$G_{NaOH} = 40 \cdot 0,1 = 4\ g.$$

Tehnica de lucru.

- pentru a obține o soluție de hidroxid de sodiu decarbonatată, se cântărește la balanța analitică o cantitate de circa 4 g de NaOH;
- granulele de hidroxid de sodiu se spală repetat de 3 - 4 ori cu apă distilată fiartă și răcită, pentru a îndepărta stratul de carbonat de la suprafața lor;
- hidroxidul de sodiu „liber" de carbonat se dizolvă în 200 - 300 cm^3 de apă distilată;
- soluția obținută se transferă într-un balon cotat;
- conținutul balonului se omogenizează cu ajutorul unei baghete de sticlă și se aduce la cotă cu apă distilată;
- soluția se transferă într-o sticlă de reactivi prevăzută cu dop de cauciuc;
- se stabilește factorul de corecție cu ajutorul unei substanțe etalon (acid oxalic), soluția de NaOH putând fi astfel folosită pentru dozări.

II.3.1.2. DETERMINAREA FACTORULUI DE CORECȚIE AL SOLUȚIEI APROXIMATIVE DE NAOH 0,1 N

Principiul metodei. Determinarea factorului de corecție al soluției aproximative de NaOH 0,1 n se bazează pe reacția de neutralizare dintre hidroxidul de sodiu și acidul oxalic ($C_2O_4H_2$):

$$(2H^+ + C_2O_4^{2-}) + 2(Na^+ + HO^-) \rightarrow (2Na^+ + C_2O_4^{2-}) + 2H_2O$$

Un volum exact măsurat dintr-o soluție etalon de acid oxalic se neutralizează cu un volum de soluție aproximativă de hidroxid de sodiu. Punctul final al titrării, respectiv punctul de echivalență, se determină folosind ca indicator fenolftaleina care are domeniul de viraj în mediu alcalin (colorație roz).

Tehnica de lucru.

a) **Prepararea unei soluții etalon de acid oxalic 0,1 n.**

Cunoscând că $M_{C_2O_4H_2} \cdot 2H_2O$ = 126,067 g,

iar $Eg_{C_2O_4H_2} \cdot 2H_2O = \frac{M}{2} = \frac{126,067}{2}$ = 63,0333 g

► se cântărește la balanța analitică într-o fiolă de cântărire, o cantitate de 0,6303 g acid oxalic, deoarece:

$$G_{C_2O_4H_2} \cdot 2H_2O = E \cdot n \cdot V = 63,0333 \cdot 0,1 \cdot 100 = 0,6333 \text{ g.}$$

► cristalele de acid oxalic se dizolvă în apă distilată și soluția rezultată se trece cantitativ într-un balon cotat de 100 cm^3;

► se agită și se aduce volumul total la 100 cm^3 cu apă distilată;

► soluția se omogenizează prin agitare.

b) **Stabilirea factorului de corecție:**

◆ într-un pahar Erlenmeyer se măsoară 10 cm^3 soluție etalon de acid oxalic 0,1 n (V_e);

◆ paharul se încălzește la temperatura de 60-70°C pe o baie de apă pentru eliminarea dioxidului de carbon;

◆ se adaugă 2-3 picături de fenolftaleină (soluție alcoolică 0,1%); fenolftaleina în mediu acid este incoloră, în mediu bazic este colorată în roșu-carmin, iar la punctul de echivalență în roz;

◆ se umple biureta (cu clemă) cu soluția aproximativă de NaOH 0,1 n;

◆ se evacuează aerul din vârful picător al biuretei și se aduce meniscul inferior al soluției tangent la o diviziune (de obicei zero) de pe biuretă (V_1);

◆ se titrează soluția caldă de acid oxalic adăugând, picătură cu picătură, soluția de NaOH din biuretă până în momentul când o singură picătură adăugată determină apariția unei culori roz datorată virajului indicatorului la punctul de echivalență;

◆ culoarea persistă aproximativ 30 de secunde; după acest interval de timp, datorită absorbției dioxidului de carbon din atmosferă, mediul de reacție devine slab acid și coloranția dispare;

◆ se citește la biuretă diviziunea la care a ajuns volumul de soluție după efectuarea titrării (V_2);

◆ volumul soluției aproximative de NaOH 0,1 n, consumată în reacția de neutralizare (V_r), se calculează făcând diferența:

$$V_r = (V_2 - V_1)\ cm^3\ NaOH\ 0,1\ n.$$

◆ pentru o determinare riguroasă se efectuează un număr de cel puțin trei titrări.

Calculul:

$$F_{NaOH} = \frac{V_e}{V_r} = \frac{V_{C_2O_4H_2}}{V_{NaOH}} = \frac{10}{(V_2 - V_1)}$$

Dacă valorile factorilor calculați pe baza celor trei titrări nu diferă între ele cu mai mult de două unități la a patra zecimală, se calculează media lor care reprezintă factorul de corecție al soluției aproximative de NaOH 0,1 n.

II.3.1.3. DOZAREA ALCALIMETRICĂ A UNEI SOLUȚII DE ACID SULFURIC

Principiul metodei. Soluția de analizat, care conține o cantitate necunoscută de acid sulfuric, se titrează până la neutralizare cu o soluție de bază (NaOH) cu factor cunoscut, în prezența fenolftaleinei ca indicator:

$$(2H^+ + SO_4^{2-}) + 2(Na^+ + HO^-) \rightarrow (2Na^+ + SO_4^{2-}) + 2H_2O \qquad (1)$$

Pe baza volumului soluției de hidroxid de sodiu consumat se calculează cantitatea de acid sulfuric din proba de analizat.

Tehnica de lucru.

► într-un pahar Erlenmeyer ce conține proba de analizat se introduc 2 - 3 picături de fenoftaleină (soluție alcoolică 0,1%);

► se citește la biuretă volumul inițial al soluției de NaOH 0,1 n cu factor cunoscut (V_1);

► soluția de analizat se titrează adăugând din biuretă, picătură cu picătură, soluția de NaOH 0,1 n până la apariția unei colorații roz - slab care trebuie să persiste 30 de secunde;

► se citește la biuretă volumul final al soluției de NaOH 0,1 n (V_2) la care s-a ajuns după titrare;

► se stabilește, prin diferență, volumul efectiv consumat la titrare.

$$V_{NaOH} = (V_2 - V_1)\ cm^3\ NaOH\ 0,1\ n.$$

Calculul: Cantitatea de H_2SO_4 din proba de analizat se calculează aplicând formula generală de calcul folosită în volumetrie:

$$\text{g substanță de dozat} = (V \cdot F \cdot n)_{\text{reactiv}} \cdot mE_{\text{substanță de dozat}} \qquad (2)$$

în care: V = volumul soluției de reactiv consumat la titrare;
F = factorul de corecție al soluției de reactiv;
n = normalitatea soluției de reactiv;
mE = miliechivalentul substanței de dozat.

Pentru a deduce această formulă se calculează în primul rând echivalentul gram al H_2SO_4 și al NaOH:

$$E_{H_2SO_4} = \frac{98}{2} = 49\ g;\ mE_{H_2SO_4} = 0,049\ g,$$

$$E_{NaOH} = \frac{40}{1} = 40\ g;\ mE_{NaOH} = 0,040\ g.$$

Din ecuația reacției chimice (1) se constată că doi echivalenți gram de NaOH neutralizează o moleculă gram de H_2SO_4, adică doi echivalenți de H_2SO_4. Prin urmare:

$$1\ Eg_{NaOH}\ neutralizează\ 1\ Eg_{H_2SO_4},$$

$$1\ mEg_{NaOH}\ neutralizează\ 1\ mEg_{H_2SO_4}.$$

Deoarece 1 cm^3 NaOH 0,1 n neutralizează (0,049·0,1) g H_2SO_4, atunci ($V_{NaOH} \cdot F_{NaOH}$) cm^3 NaOH 0,1 n vor neutraliza ($V_{NaOH} \cdot F_{NaOH} \cdot 0,1 \cdot 0,049$) g H_2SO_4. Conform formulei de calcul (2), rezultă că:

$$g\ H_2SO_4 = (V \cdot F \cdot 0,1)_{NaOH} \cdot 0,049.$$

II.3.2. ACIDIMETRIA

Reprezintă metoda de dozare volumetrică a bazelor tari, a bazelor slabe și a sărurilor cu hidroliză bazică prin neutralizare cu un volum determinat (măsurat) din soluția titrată a unui **acid**. În acidimetrie se utilizează în mod curent soluții titrate ale unor acizi ca: $H_2C_2O_4$, HCl, H_2SO_4.

Pentru determinarea concentrației diferitelor baze este necesar să se prepare soluții standard de acizi, respectiv soluții de concentrație cunoscută (exactă).

Majoritatea acizilor folosiți în acidimetrie se prezintă inițial sub formă de soluții concentrate care nu îndeplinesc condițiile de soluții etalon. Prin diluarea soluțiilor concentrate de acizi se obțin soluții

aproximative. Folosirea acestor soluții în acidimetrie presupune standardizarea lor, adică determinarea factorului de corecție.

II.3.2.1. PREPARAREA UNEI SOLUȚII APROXIMATIVE DE HCl 0,1 N

Soluția aproximativă de HCl 0,1 n se prepară plecând de la o soluție concentrată de HCl care conține 37 g HCl gazos la 100 cm^3 soluție și are densitatea (ρ) egală cu 1,19. Concentrația acestei soluții de HCl nu este însă stabilă, deoarece HCl fumegă.

Teoretic, soluția de HCl 0,1 n trebuie să conțină în 1000 cm^3 cantitatea de:

$$E_{HCl} \cdot n = 36,45 \cdot 0,1 = 3,645\ g \quad \text{HCl gazos}$$

Practic, din soluția comercială de HCl cu concentrația 37% se prepară o soluție aproximativă de HCl 0,1 n, pe baza raționamentului următor:

37 g HCl gazos se află în 100 g HCl soluție concentrată;

3,645 g HCl gazos se vor afla în x g HCl soluție concentrată:

$$x = \frac{3,65 \cdot 100}{37} = 9,85\ g\ HCl \qquad \text{(soluție concentrată)}$$

Deoarece cântărirea unei soluții este mai dificil de realizat, se transformă greutatea soluției concentrate de HCl în volum.

Cunoscând că densitatea (ρ) se definește ca fiind masa unității de volum ($\rho = \frac{G}{V}$) , rezultă că:

$$V = \frac{G}{\rho} = \frac{9,85}{1,19} = 8,27 \qquad cm^3 \text{ HCl soluție concentrată.}$$

În Sistemul Internațional de Unități (SI) densitatea sau masa volumetrică se exprimă în kilograme pe metru cub (Kg/m^3).

Tehnica de lucru.

► într-un balon cotat de 1000 cm^3 se introduc aproximativ 700 cm^3 de apă distilată;

► într-un cilindru gradat de 10 cm^3 sau cu o pipetă gradată de 10 ml se măsoară 8,3 cm^3 HCl soluție 37% (ρ = 1,19) care se transvasează în balonul cu apă distilată;

► se omogenizează cu ajutorul unei baghete de sticlă;

► se aduce volumul total al soluției la 1000 cm^3 cu apă distilată;

► soluția aproximativă de HCl 0,1 n astfel preparată se trece într-o sticlă de reactivi;

► se stabilește factorul de corecție cu ajutorul unei substanțe etalon (standard) primar (Na_2CO_3), soluția de HCl putând fi astfel folosită pentru dozări.

II.3.2.2. DETERMINAREA FACTORULUI DE CORECȚIE AL SOLUȚIEI APROXIMATIVE DE HCl 0,1 N

Principiul metodei cu carbonat de sodiu. Determinarea factorului de corecție al soluției aproximative de HCl 0,1 n se bazează pe reacția dintre carbonatul de sodiu și acidul clorhidric:

$$(2Na^+ + CO_3^{2-}) + 2(H^+ + Cl^-) \rightarrow 2(Na^+ + Cl^-) + H_2O + CO_2.$$

Un volum precis măsurat dintr-o soluție etalon cu concentrație exactă de carbonat de sodiu (V_e) se neutralizează cu un volum de soluție aproximativă de HCl. Punctul final al titrării, respectiv punctul de echivalență se determină folosind ca indicator **metiloranjul** care are domeniul de viraj în mediu acid (coloratie roșie).

Obținerea carbonatului de sodiu - substanță etalon - se face din bicarbonat de sodiu pur, încălzit în cuptor electric la 270 - 300°C timp de o oră. Încălzirea se repetă până la greutate constantă.

Tehnica de lucru.

► se umple o biuretă prevăzută cu robinet cu soluția aproximativă de HCl 0,1 n;

► se evacuează aerul din vârful picător al biuretei și se aduce meniscul inferior al soluției tangent la o diviziune V_1 (de preferat diviziunea zero);

► într-un pahar Erlenmeyer se măsoară, cu exactitate, 10 cm^3 soluție etalon de Na_2CO_3 0,1 n (V_e);

► se adaugă 1 - 2 picături de indicator metiloranj care, dat fiind mediul alcalin, se colorează în galben, culoare pe care o imprimă soluției de Na_2CO_3;

► se adaugă, picătură cu picătură, soluția HCl 0,1 n din biuretă până în momentul când culoarea soluției care se titrează virează de la galben la roșu (virajul indică punctul de echivalență, metiloranjul fiind portocaliu în mediu neutru);

► se citește la biuretă diviziunea la care a ajuns volumul de soluție după efectuarea titrării (V_2);

► prin diferență, se determină volumul soluției aproximative de HCl 0,1 n folosit la titrare (V_r):

$$V_r = (V_2 - V_1)\ cm^3\ HCl\ 0,1\ n;$$

► se efectuează trei determinări succesive.

Calculul:

$$F_{HCl} = \frac{V_e}{V_r} = \frac{V_{Na_2CO_3}}{V_{HCl}} = \frac{10}{(V_2 - V_1)}.$$

Se fac mai multe determinări ale factorilor de corecție pentru aceeași soluție.

Se face media valorilor factorilor determinați numai dacă aceștia diferă cu cel mult două unități la a patra zecimală; se obține astfel factorul de corecție al soluției aproximative de HCl 0,1 n.

Principiul metodei cu borax. Determinarea factorului de corecție al soluției aproximative de HCl 0,1 n se bazează pe reacția dintre borax și acidul clorhidric:

$$(2Na^+ + B_4O_7^{2-}) + 2(H^+ + Cl^-) + 5H_2O \rightarrow$$

$$\rightarrow 4(3H^+ + BO_3^{3-}) + 2(Na^+ + Cl^-)$$

O cantitate de borax cântărită exact și trecută în soluție se neutralizează cu un volum de soluție aproximativă de acid clorhidric.

Punctul final al titrării, respectiv punctul de echivalență, se determină folosind ca indicator roșu de metil care are domeniul de viraj în mediu acid (coloratie roșie).

Stabilirea titrului soluției aproximative de HCl 0,1 n se poate face utilizând și o soluție etalon (standard) secundar și anume soluția de NaOH cu titrul cunoscut.

Tehnica de lucru.

► boraxul comercial se recristalizează de 2 - 3 ori din apă distilată, se filtrează și se usucă;

► din substanța etalon astfel obținută se cântăresc exact 0,6 - 0,8 g care se dizolvă în 30 - 40 cm^3 apă distilată;

► se evacuează aerul din vârful picător al biuretei și se aduce meniscul inferior al soluției tangent la o diviziune V_1 (de preferat diviziunea zero);

► peste soluția etalon de borax se adaugă 1 - 2 picături de indicator roșu de metil care, dat fiind mediul alcalin, se colorează în galben;

► se adaugă, picătură cu picătură, soluția de HCl 0,1 n din biuretă până în momentul în care culoarea soluției care se titrează virează de la galben la roșu;

► se citește la biuretă diviziunea la care a ajuns volumul de soluție după efectuarea titrării (V_2);

► prin diferență, se determină volumul soluției aproximative de HCl 0,1 n folosit la titrare (V_r):

$$V_r = (V_2 - V_1)\ cm^3\ HCl\ 0,1\ n.$$

Se efectuează trei determinări succesive.

Calculul:

$$T_r = \frac{S \cdot 36,461}{V_r \cdot 190,686}\ g/cm^3, \qquad \text{în care:}$$

S = reprezintă g borax cântărit;

V_r = volumul soluției de HCl 0,1 n folosit la titrare;

36,461 = echivalentul gram al HCl;

190,686 = echivalentul gram al $Na_2B_4O_7$.

Titrul teoretic al soluției de HCl 0,1 n se calculează din relația:

$$T_t = n \cdot mE = 0,1 \cdot 0,0364 = 0,0036\ g/cm^3.$$

Factorul de corecție se calculează făcând raportul de mai jos:

$$F_{HCl} = \frac{T_r}{T_t}.$$

II.3.2.3. DOZAREA ACIDIMETRICĂ A SOLUȚIILOR DE HIDROXID DE SODIU

Principiul metodei. Hidroxidul de sodiu din proba de analizat se titrează până la neutralizare cu o soluție de acid (HCl) cu factor cunoscut, în prezență de **metiloranj** ca indicator:

$$(Na^+ + OH^-) + (H^+ + Cl^-) \rightarrow (Na^+ + Cl^-) + H_2O$$

Din volumul soluției de acid clorhidric folosit la titrare se calculează cantitatea de hidroxid de sodiu din proba de analizat.

Tehnica de lucru.

► proba de analizat conținută într-un pahar Erlenmeyer se diluează cu 25 - 30 cm^3 de apă distilată;

► se adaugă 2 - 3 picături de metiloranj care imprimă soluției o colorație galbenă;

► se citește la biuretă volumul inițial de HCl 0,1 n cu factor cunoscut (V_1);

► se titrează cu soluție de HCl 0,1 n, cu factor cunoscut, până în momentul când indicatorul virează de la galben la portocaliu;

► se citește la biuretă volumul final al soluției de HCl 0,1 n folosit la titrare (V_2);

► se stabilește, prin diferență, volumul de acid consumat la titrare (V_{HCl}):

$$V_{HCl} = (V_2 - V_1)\ cm^3\ HCl\ 0,1\ n.$$

Calculul. Cantitatea de NaOH din proba de analizat se calculează aplicând formula generală de calcul:

$$g\ NaOH = (V \cdot F \cdot n)_{HCl} \cdot mE_{NaOH}$$

în care V_{HCl} = volumul de HCl 0,1 n folosit la titrare;

F = factorul de corecție al soluției de HCl 0,1 n;

n = normalitatea soluției de HCl 0,1 n.

II.4. VOLUMETRIA PRIN REACȚII DE OXIDO - REDUCERE

II.4.1. GENERALITĂȚI

Metodele volumetrice bazate pe reacții de oxido - reducere cuprind acele metode cantitative care se realizează prin titrarea substanțelor oxidante cu reducători și a substanțelor reducătoare cu oxidanți.

Aceste metode se bazează pe reacțiile care se petrec prin **transfer de electroni** între substanțele participante la reacții.

Oxidarea este un proces prin care se cedează electroni, respectiv numărul sarcinilor pozitive crește sau se reduce numărul sarcinilor negative.

În general, o reacție de oxidare se poate formula astfel:

$$pA_{red} - mpe^- \rightleftharpoons pB_{ox} \quad (1)$$

în care: A_{red} = forma redusă sau reducătorul;

mpe^- = numărul de electroni cedați;

B_{ox} = forma oxidată sau oxidantul;

p = coeficient stoechiometric.

Oxidarea mai poate fi considerată ca:

- un proces de combinare a unui element sau a unei substanțe compuse cu oxigenul:

$$A + O_2 \rightarrow AO_2;$$

- un proces prin care se micșorează cantitatea de hidrogen din moleculă:

$$BH_2 + H_2O_2 \rightarrow B + H_2O;$$

- o creștere a valenței poxitive:

$$A^0 - 2\,e^- \rightarrow A^{2+};$$

- o scădere a valenței negative a elementului oxidat:

$$B^{2-} - 2\,e^- \rightarrow B^0.$$

Reducerea este un proces care decurge cu acceptare de electroni și se reduce numărul sarcinilor pozitive.

Reacția de reducere se poate formula astfel:

$$pB_{ox} + mpe^- \rightleftarrows pA_{red} \quad (2)$$

în care: B_{ox} = forma oxidată sau oxidantul;

mpe^- = numărul de electroni primiți;

A_{red} = forma redusă sau reducătorul;

p = coeficient stoechiometric.

Reducerea mai poate fi considerată și ca:

- un proces de îmbogățire a unei substanțe în hidrogen:

$$A + H_2 \rightarrow AH_2;$$

► un proces de micșorare a cantității de oxigen dintr-o substanță:

$$B_2O + H_2 \rightarrow 2B + H_2O;$$

► o scădere a valenței pozitive:

$$A^{4+} + 2\,e^- \rightarrow A^{2+};$$

► o mărire a valenței negative:

$$B^{2-} + 2\,e^- \rightarrow B^{4-}.$$

Reacțiile redox (oxido-reducere) includ două sisteme redox simple alcătuind un sistem redox dublu, în care oxidarea și reducerea sunt două procese care se produc simultan. Însumând reacția (1) și reacția (2) se obține:

$$pA_{red_1} - mpe^- \rightleftharpoons pB_{ox_1}$$

$$pB_{ox_2} + mpe^- \rightleftharpoons pA_{red_2}$$

$$pB_{ox_1} + pA_{red_2} \rightleftharpoons pB_{ox_2} + pA_{red_1}$$

în care: - B_{ox_1} și B_{ox_2} sunt formele oxidate ale sistemelor 1 și, respectiv 2;

- A_{red_2} și A_{red_1} sunt formele reduse ale sistemelor 2 și, respectiv 1.

Reacțiile redox sunt reversibile și la baza lor stă echilibrul dinamic a cărui deplasare depinde de natura celor două sisteme redox simple, precum și de condițiile experimentale.

Reactivitatea unui cuplu redox este determinată de tendința de a pierde sau a câștiga electroni, tendință ce se măsoară prin **potențialul redox** al sistemului.

Deplasarea unei reacții redox într-un sens sau altul depinde în primul rând de valoarea diferenței dintre potențialele de oxidare ale

celor două cupluri simple (tensiunea electromotoare, t.e.m.); cu cât această valoare este mai mare, cu atât viteza de reacție este mai mare.

Potențialul redox poate fi ușor calculat conform relației elaborate de Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$, în care:

- E = potențialul redox în volți;
- E^0 = potențialul standard în volți;
- R = constanta gazelor egală cu 8,314 jouli/grd/mol;
- T = temperatura absolută, în grade Kelvin;
- n = numărul de electroni transferați;
- F = constanta lui Faraday (96500 Coulombi);
- a_{ox} = activitatea formei oxidate;
- a_{red} = activitatea formei reduse.

În volumetria bazată pe reacții redox, punctul de echivalență se stabilește folosind indicatori de diferite tipuri:

- ◆ indicatori de culoare; ◆ indicatori de fluorescență;
- ◆ indicatori de absorbție; ◆ indicatori turbidimetrici;
- ◆ indicatori reactivi ai ionilor.

Indicatorii folosiți sunt:

- ■ substanțe chimice care au capacitatea de a reacționa specific cu unul dintre reactanți conducând la un compus colorat (ex. iodul dă cu amidonul o coloratie albastră).
- ■ substanțe colorate participante la reacția redox și care, în exces, imprimă o anumită culoare soluției (ex. $KMnO_4$).
- ■ substanțe care se prezintă în două forme, oxidată și redusă, colorate diferit (ex. Cr^{6+} este de culoare portocalie și Cr^{3+} este colorat în verde).

Punctul de echivalență se mai poate determina și prin măsurarea potențialului redox al sistemului, care se modifică odată cu modificarea concentrației reactanților (titrare potențiometrică).

Metodele volumetrice bazate pe reacții redox pot fi clasificate în funcție de:

- natura oxidanților: $KMnO_4$, $K_2Cr_2O_7$, I_2, KIO_3;

- natura reducătorilor: Na_2SO_3, $C_2O_4H_2$, $FeSO_4$.

Manganometria și iodometria sunt metodele volumetrice redox cele mai folosite.

II.4.2. MANGANOMETRIA

Manganometria sau permanganometria este o metodă de dozare volumetrică bazată pe reacții de oxido - reducere prin care se dozează substanțe reducătoare, la care participă drept substanță oxidantă permanganatul de potasiu ($KMnO_4$).

Soluția de permanganat de potasiu poate funcționa ca oxidant în trei moduri diferite, după cum mediul de reacție este **acid**, **neutru** sau **alcalin.**

În practica analitică se utilizează manganometria în **mediu puternic acid**, care decurge după următoarea schemă de reacție:

$$MnO_4^- + 8\,H^+ + 5\,e^- \rightleftharpoons Mn^{2+} + 4\,H_2O$$

Ionul de mangan, prin reducere, își modifică valența de la 7^+ la 2^+:

$$Mn^{7+} + 5\,e^- \rightleftharpoons Mn^{2+}$$

În dozările manganometrice indicatorul folosit pentru recunoașterea punctului de echivalență este însuși permanganatul de potasiu $KMnO_4$ care colorează intens în roșu violet soluțiile sale, iar la sfârșitul titrării se transformă în ioni Mn^{2+} incolori. Un mic exces de $KMnO_4$ colorează soluția în **roz.**

II.4.2.1. PREPARAREA SOLUȚIEI DE $KMnO_4$ APROXIMATIV 0,1 N

Pentru a prepara o soluție de $KMnO_4$ 0,1 n se calculează inițial echivalentul gram al permanganatului de potasiu.

Deoarece $KMnO_4$ acționează ca oxidant, valența manganului se va micșora în mediu acid trecând de la valența 7^+ la valența 2^+. Această schimbare de valență se face prin câștig de electroni pe care Mn^{7+} îi primește de la substanța reducătoare.

Reacția de bază în manganometrie este:

$$2(K^+ + MnO_4^-) + 3(2H^+ + SO_4^{2-}) \rightarrow$$

$$\rightarrow (2K^+ + SO_4^{2-}) + 2(Mn^{2+} + SO_4^{2-}) + 3H_2O + 5O$$

Schimbul de electroni este următorul:

$$Mn^{7+} + 5\ e^- \rightarrow Mn^{2+} \text{ (reducere)}$$
$$O^{2-} - 2\ e^- \rightarrow O^0 \text{ (oxidare)}$$

Dacă în reacție ionul Mn^{7+} din permanganatul de potasiu acceptă **cinci electroni**, rezultă că echivalentul gram al $KMnO_4$ în mediu acid este:

$$Eg_{KMnO_4} = \frac{M_{KMnO_4}}{5e^-} = \frac{158}{5} = 31,6\ g$$

Pentru 1000 cm^3 soluție n/10 (0,1 n) este necesară o cantitate de permanganat de potasiu egală cu:

$$G = n \cdot E \cdot V = 0,1 \cdot 31,6 = 3,16 \text{ g } KMnO_4$$

Permanganatul de potasiu nu este o substanță etalon și, de aceea, trebuie ca soluției de $KMnO_4$ 0,1 n să i se stabilească factorul de corecție.

Tehnica de lucru.

- se cântăresc aproximativ 3,2 g $KMnO_4$;
- cristalele de $KMnO_4$ se transferă într-un balon cotat de 1000 cm^3 și se dizolvă în apă distilată prin agitare energică;
- se aduce la cotă cu apă distilată;

► soluția obținută se fierbe timp de o oră sau se lasă la temperatura camerei timp de 7 - 8 zile;

► se filtrează pe un creuzet cu masă filtrantă care reține urmele de MnO_2;

► soluția aproximativă de $KMnO_4$ 0,1 n astfel obținută se transvazează într-o sticlă de reactiv de culoare brună, deoarece lumina catalizează descompunerea permanganatului.

II.4.2.2. DETERMINAREA FACTORULUI DE CORECȚIE AL SOLUȚIEI DE $KMnO_4$ APROXIMATIV 0,1 N

Pentru a stabili factorul de corecție al soluției de $KMnO_4$ aproximativ 0,1 n este necesară o soluție etalon de acid oxalic 0,1 n.

Tehnica de lucru.

► într-un vas de titrare se introduc 10 cm^3 (V_e) soluție etalon de $C_2O_4H_2$ 0,1 n;

► se adaugă 10 cm^3 de H_2SO_4 20%;

► vasul de titrare se încălzește pe sită până la temperatura de 75-80ºC, fără a se fierbe;

► soluția etalon fierbinte se titrează cu soluție aproximativă de $KMnO_4$ 0,1 n până la apariția unei colorații slab roz;

► indicatorul este chiar soluția violetă de $KMnO_4$ care nu se mai decolorează în urma reducerii de către acidul oxalic, deoarece acesta din urmă a fost consumat în întregime în reacția de oxido - reducere;

► se citește și se stabilește la biuretă volumul efectiv al soluției de $KMnO_4$ 0,1 n utilizat la titrare (V_t);

► se fac în paralel trei probe notându-se volumele corespunzătoare de soluție de $KMnO_4$ 0,1 n.

Calculul se face pe baza următorului raționament:

$$V_{KMnO_4\ 0,1\ n} \ x \ F_{KMnO_4} = V_{C_2O_4H_2\ 0,1\ n} \ x \ F_{C_2O_4H_2\ 0,1\ n}$$

$$F_{KMnO_4\ 0,1\ n} = \frac{V_{C_2O_4H_2} \times F_{C_2O_4H_2}}{V_{KMnO_4}} = \frac{V_e \times 1}{V_r} = \frac{10}{V_r}$$

Se face media valorilor factorilor pe baza celor trei determinări, stabilindu-se astfel factorul de corecție al soluției aproximative de $KMnO_4$ 0,1 n.

II.4.2.3. DOZAREA MANGANOMETRICĂ A APEI OXIGENATE

Principiul metodei. În mediu acid, sub acțiunea oxidantă a apei oxigenate, starea de oxidare a ionului Mn^{7+} din permanganatul de potasiu se modifică de la 7^+ la 2^+, conform reacției:

$$5H_2O_2 + 2(K^+ + MnO_4^-) + 3(2H^+ + SO_4^{2-}) \rightarrow$$
$$\rightarrow 2(Mn^{2+} + SO_4^{2-}) + (2K^+ + SO_4^{2-}) + 8H_2O + 5O_2$$

În această reacție de reducere a ionului Mn^{7+} schimbul de electroni este următorul:

$$Mn^{7+} + 5e^- \rightarrow Mn^{2+}$$
$$O^{2-} - 2e^- \rightarrow O^0$$

Echivalentul gram al apei oxigenate va fi:

$$Eg_{H_2O_2} = \frac{M}{2e^-} = \frac{34}{2} = 17\ g$$

Soluția de H_2O_2 de analizat este titrată cu o soluție de permanganat de potasiu de titru cunoscut, în prezența acidului sulfuric, până când un mic exces de $KMnO_4$ colorează soluția în roz.

Tehnica de lucru:

- ► într-un pahar de titrare se măsoară 5 cm^3 soluție de H_2O_2;
- ► se adaugă 5 cm^3 soluție de H_2SO_4 20%;
- ► se spală pereții vasului cu un jet de apă distilată;

► se umple o biuretă prevăzută cu robinet cu soluție de $KMnO_4$ 0,1 n;

► soluția de H_2O_2 se titrează cu o soluție de $KMnO_4$ 0,1 n până la colorarea soluției în roz;

► se notează cu V_r volumul soluției titrate de $KMnO_4$ 0,1 n folosit.

Calculul. Cantitatea de apă oxigenată din proba de analizat va fi calculată conform relației:

$$g\,H_2O_2 = (V_r \cdot F \cdot n)_{KMnO_4} \cdot mE_{H_2O_2}$$, unde:

V_r = volumul soluției de $KMnO_4$ 0,1 n;
F = factorul de corecție al soluției de $KMnO_4$ 0,1 n;
n = normalitatea soluției de $KMnO_4$ 0,1 n;
$mE_{H_2O_2} = 0,017$

II.4.3. IODOMETRIA

Iodometria cuprinde totalitatea metodelor de analiză volumetrică bazate pe reacții de oxido - reducere la care participă iodul și anume:

a) $$I_2 + 2\,e^- \rightleftarrows 2\,I^-,$$

în care iodul funcționează ca oxidant și,

b) $$2\,I^- - 2\,e^- \rightleftarrows I_2,$$

în care anionul de I^- se comportă ca reducător.

În general, metodele iodometrice de dozare sunt indirecte, utilizându-se doi reactivi volumetrici și anume:

- o soluție de I_2 sau
- o soluție de KI.

Metodele iodometrice de dozare se împart în două grupe:

• Metodele iodometrice de dozare a substanțelor reducătoare, utilizând ca reactiv volumetric o soluție titrată de iod (I_2).

• Metodele iodometrice de dozare a substanțelor oxidante, utilizând ca reactiv volumetric o soluție de iodură de potasiu (KI).

În acest din urmă caz, soluția de iod se prepară prin dizolvarea iodului în soluție de iodură de potasiu, reacția redox putând fi formulată astfel:

$$I_3^- + 2\,e^- \rightleftarrows 3\,I^-$$

În ambele cazuri, atât iodul existent în exces în prima metodă, cât și iodul pus în libertate în reacțiile de oxidare a anionului I^- se determină volumetric prin titrarea cu o soluție de tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3 \cdot 5\,H_2O$) cu factor cunoscut.

Între iod și tiosulfat are loc următoarea reacție:

$$I_2 + 2\,S_2O_3^{2-} \rightarrow 2\,I^- + S_4O_6^{2-} \qquad \text{sau}$$

$$I_2 + 2\,(2\,Na^+ + S_2O_3^{2-}) \rightleftarrows 2\,(Na^+ + I^-) + (2\,Na^+ + S_4O_6^{2-})$$

Deci, pentru doi atomi de iod este nevoie de două molecule de tiosulfat de sodiu; deoarece în reacție se schimbă doi electroni, echivalentul tiosulfatului de sodiu, cristalizat cu cinci molecule de apă ($Na_2S_2O_3 \cdot 5\,H_2O$), va fi egal cu masa sa moleculară (248,1825), iar echivalentul iodului va fi egal cu masa sa atomică (126,9044).

Reacția dintre iod și tiosulfat este rapidă, totală și **punctul de echivalență** poate fi pus în evidență cu o soluție de **amidon 1 %** care formează cu iodul un produs de incluziune colorat în albastru intens.

II.4.3.1. PREPARAREA UNEI SOLUȚII APROXIMATIVE DE I_2 0,1 N

Pentru prepararea a 1000 cm^3 soluție aproximativă de iod 0,1 n este necesară cantitatea calculată astfel:

$$G_{I_2} = n \cdot E = 0,1 \cdot 126,904 = 12,6904\ g\ I_2$$

Tehnica de lucru.

► într-o fiolă de cântărire cu dop șlefuit se cântăresc la balanța analitică 12,6904 g I_2 p.a.;

► cristalele de iod se transferă într-un balon cotat de 1000 cm^3 care conține o soluție concentrată de iodură de potasiu (iodul fiind puțin solubil în apă, soluția de KI îi mărește solubilitatea);

► se agită soluția pentru a definitiva dizolvarea iodului;

► se completează cu apă distilată la volumul de 1000 cm^3.

Factorul de corecție al soluției de I_2 0,1 n astfel obținută se stabilește folosind o soluție etalon secundar de tiosulfat de sodiu 0,1 n.

II.4.3.2. PREPARAREA SOLUȚIEI DE $Na_2S_2O_3$ APROXIMATIV 0,1 N

Pentru a prepara o soluție de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n se calculează inițial, cantitatea necesară:

$$G_{Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O} = n \cdot E = 0,1 \cdot 248,22 = 24,82\ g$$

Tehnica de lucru.

► se cântăresc la balanța analitică 25 g tiosulfat de sodiu;

► tiosulfatul de sodiu se dizolvă în 200 - 300 cm^3 apă distilată fiartă și răcită, pentru a evita reacția dintre tiosulfatul de sodiu și dioxidul de carbon care determină formarea de carbonat acid de sodiu, acid sulfuros și sulf;

► soluția se transferă într-un balon cotat de 1000 cm^3 care se aduce la cotă cu apă distilată fiartă și răcită;

► soluția aproximativă de tiosulfat de sodiu 0,1 n astfel obținută se lasă pentru stabilizare 8 - 10 zile la temperatura laboratorului;

► factorul de corecție al soluției de tiosulfat de sodiu 0,1 n se stabilește cu ajutorul unei soluții etalon primar de dicromat de potasiu.

II.4.3.3. PREPARAREA UNEI SOLUȚII ETALON DE $K_2Cr_2O_7$ 0,1 N

Dicromatul de potasiu, în mediu de H_2SO_4, oxidează ionul I^- cu formare de iod în cantitate echivalentă:

$$(2K^+ + Cr_2O_7^{2-}) + 6(K^+ + I^-) + 7(2H^+ + SO_4^{2-}) \rightarrow$$

$$\rightarrow 4(2K^+ + SO_4^{2-}) + 2Cr^{3+} + 3SO_4^{2-} + 3I_2 + 7H_2O$$

Iodul eliberat din reacție se titrează cu o soluție de tiosulfat de sodiu, în prezența amidonului ca indicator:

$$I_2 + 2(2Na^+ + S_2O_3^{2-}) \rightarrow 2(Na^+ + I^-) + (2Na^+ + S_4O_6^{2-})$$

Conform reacției de mai sus, rezultă că echivalentul dicromatului de potasiu se calculează împărțind masa moleculară la **6** (numărul total de electroni acceptați de ionii Cr^{6+} pentru a trece în ioni Cr^{3+}).

$$E_{K_2Cr_2O_7} = \frac{249,192}{6} = 41,532;\ mE_{K_2Cr_2O_7} = 0,04153$$

Cantitatea de substanță necesară pentru prepararea a 100 cm^3 soluție etalon de $K_2Cr_2O_7$ 0,1 n este:

$$G_{K_2Cr_2O_7} = n \cdot E \cdot V = 0,1 \cdot 41,532 \cdot 0,1 = 0,4153\ g$$

Tehnica de lucru:

► se cântăresc exact la balanța analitică 0,4153 g dicromat de potasiu;

► se transferă cantitativ într-un balon cotat de 100 cm^3 și se spală fiola de cântărire cu apă distilată;

► se omogenizează prin agitare și se aduce volumul la 100 cm^3 cu apă distilată;

► soluția astfel obținută se transferă într-o sticlă brună și poate fi utilizată ca etalon primar pentru determinarea factorului de corecție al soluției aproximative de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n.

II.4.3.4. DETERMINAREA FACTORULUI DE CORECȚIE AL SOLUȚIEI APROXIMATIVE DE $Na_2S_2O_3$ 0,1 N

Principiul metodei. Dicromatul de potasiu reacționează cu iodura de potasiu, în prezența acidului sulfuric conform reacției:

$$K_2Cr_2O_7 + 6\ KI + 7\ H_2SO_4 \rightarrow 4\ K_2SO_4 + Cr_2(SO_4)_3 + 3\ I_2 + 7\ H_2O$$

Schimbul electronic este următorul:

$$Cr^{6+} + 3\ e^- \rightarrow Cr^{3+}$$
$$I^- - 1\ e^- \rightarrow I$$

Numărul de electroni schimbați fiind impar, coeficienții se dublează.

Iodul pus în libertate în reacția cu cantitatea echivalentă de $K_2Cr_2O_7$, se titrează cu o soluție de tiosulfat de sodiu, în prezența amidonului ca indicator.

$$I_2 + 2\ Na_2S_2O_3 \rightarrow 2\ NaI + Na_2S_4O_6.$$

Tehnica de lucru.

► într-un pahar de titrare cu dop rodat se introduc exact 10 cm^3 soluție etalon de dicromat de potasiu 0,1 n (V_e);

► se adaugă 10 cm^3 soluție de KI 15% și 10 cm^3 soluție de H_2SO_4 20% (soluția este portocalie datorită ionului Cr^{6+});

► paharul se astupă cu dopul rodat, se agită conținutul și se lasă în repaus la întuneric timp de 5 minute;

► peste soluția de culoare brună, datorită iodului pus în libertate, se adaugă 50 cm^3 apă distilată;

► se titrează iodul eliberat cu o soluție aproximativă de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n, până ce coloratia brună virează spre galben deschis;

► se adaugă 1 cm^3 soluție de amidon 1% ca indicator, când apare o coloratie albastră;

► se continuă titrarea până la viraj verde datorat formării ionului Cr^{3+};

► se citește la biuretă volumul soluției aproximative de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n folosit la titrare (V_r);

► determinarea se repetă de trei ori și se face media valorilor.

Calculul. Factorul de corecție al soluției aproximative de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n se stabilește din relația:

$$F_{Na_2S_2O_3} = \frac{V_e}{V_r} = \frac{V_{K_2Cr_2O_7}}{V_{Na_2S_2O_3}} = \frac{10}{V_r}.$$

II.4.3.5. DETERMINAREA FACTORULUI DE CORECȚIE AL SOLUȚIEI APROXIMATIVE DE I_2 0,1 N

Principiul metodei. Determinarea factorului de corecție al soluției aproximative de iod 0,1 n are la bază relația:

$$I_2 + 2\ Na_2S_2O_3 \rightarrow 2\ NaI + Na_2S_4O_6$$

Un volum din soluția aproximativă de iod se titrează cu un volum din soluția aproximativă de tiosulfat de sodiu cu factor cunoscut (etalon secundar), în prezența amidonului ca indicator.

Tehnica de lucru.

► într-un vas de titrare se introduc 10 cm^3 soluție de I_2 aproximativ 0,1 n (V_r);

► se titrează cu soluția de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n cu fctor cunoscut, până când coloranția inițială, brună, virează în galben;

► se adaugă 4 - 5 picături soluție de amidon 1%, care imprimă mediului de reacție o coloranție albastră;

► se continuă titrarea până ce soluția devine incoloră;

► se notează volumul soluției de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n folosit;

► determinarea se repetă de 3 ori și se calculează media aritmetică a valorilor.

Calculul. Volumul soluției aproximative de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n se standardizează prin înmulțirea cu factorul de corecție:

$$V_e = V_{Na_2S_2O_3} \cdot F_{Na_2S_2O_3}.$$

Factorul de corecție al soluției aproximative de iod 0,1 n se calculează din relația:

$$F_{I_2} = \frac{V_e}{V_r} = \frac{V_{Na_2S_2O_3} \cdot F_{Na_2S_2O_3}}{V_{I_2}}$$

$V_r = V_{I_2} = 10\ cm^3$ soluție de I_2 0,1 n

II.4.3.6. DOZAREA IODOMETRICĂ A GLUCOZEI

Principiul metodei. Glucoza, substanță cu caracter reducător, poate fi oxidată cu iod în mediu alcalin până la acid gluconic.

În prezența hidroxidului de sodiu, iodul formează iodură de potasiu și hipoiodit de sodiu:

$$I_2 + 2\ NaOH \rightarrow NaI + NaOI + H_2O \qquad (1)$$

Hipoioditul de sodiu, în mediu alcalin, oxidează glucoza până la acid gluconic, respectiv gluconat de sodiu.

$$\text{Glucoză} + NaOI + NaOH \rightarrow \text{Gluconat de sodiu} + NaI + H_2O \qquad (2)$$

Reacția globală rezultă prin însumarea reacțiilor parțiale:

$$\text{Glucoză} + I_2 + 3\ NaOH \rightarrow \text{Gluconat de sodiu} + 2\ NaI + 2\ H_2O \qquad (3)$$

Excesul de iod, aflat în mediu de reacție sub formă de iodură și hipoiodit de sodiu, se eliberează prin tratare cu acid clorhidric:

$$NaI + NaOI + 2\ HCl \rightarrow I_2 + 2\ NaCl + H_2O \qquad (4)$$

Iodul pus în libertate se titrează cu o soluție de tiosulfat de sodiu cu factorul stabilit anterior:

$$I_2 + 2\ Na_2S_2O_3 \rightarrow 2\ NaI + Na_2S_4O_6 \qquad (5)$$

Cantitatea de glucoză, din proba de analizat, se determină cunoscând volumul soluției de iod determinat prin reacția (5).

Tehnica de lucru.

► într-un pahar de titrare cu dop rodat, care conține proba de analizat, se pipetează 25 cm^3 soluție de I_2 0,1 n;

► se adaugă cu pipeta soluția de NaOH 10%, picătură cu picătură, până când coloratia brună a soluției virează în galben deschis;

► se agită și se lasă în repaus timp de 15 minute;

► proba se acidulează cu 10 cm^3 soluție de HCl 4 n, când apare o coloratie brună datorată iodului pus în libertate;

► se titrează cu soluție de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n până la apariția unei coloratii galbene;

► se adaugă 1 cm^3 soluție de amidon 1% care imprimă mediului de reacție o coloratie albastră;

► se continuă titrarea până când soluția devine incoloră;

► se înregistrează volumul total al soluției de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n folosit la titrare.

Calculul. Volumul soluției de I_2 0,1 n (V) consumat în reacția de oxidare a glucozei se stabilește astfel:

$$V = (V_{I_2} \cdot F_{I_2} - V_{Na_2S_2O_3} \cdot F_{Na_2S_2O_3})$$ cm^3 soluție de I_2 0,1 n.

V_{I_2} = volumul soluției de I_2 0,1 n produs inițial în exces;

$V_{Na_2S_2O_3}$ = volumul soluției de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n folosit la titrarea iodului rămas nereacționat.

Echivalentul glucozei se calculează pe baza reacției globale de oxidare a glucozei (3) din care rezultă că:

1 mol I_2 oxidează 1 mol glucoză (180 g), deci:

$$1\ E_{I_2} = \frac{I_2}{2}$$ oxidează $1\ E_{glucoză} = \frac{180}{2} = 90\ g$ ($mE_{glucoză} = 0,090$ g).

Introducând valorile respective în formula generală de calcul volumetric,

$$g = (V \cdot F \cdot n) \cdot mE$$ se obține:

$$g\ glucoză = (V_{I_2} \cdot F_{I_2} - V_{Na_2S_2O_3}) \cdot 0,1 \cdot 0,090$$

II.5. COMPLEXOMETRIA

Complexometria cuprinde metodele volumetrice bazate pe reacțiile de formare a combinațiilor complexe.

Combinațiile complexe sunt compuși formați dintr-un ion central (generatorul de complex) și liganzii care coordinează ionul central.

De obicei, ionul central este un metal tranzițional ce are stratul de valență incomplet. Pentru a realiza o configurație stabilă, ionul generator de complex acceptă electroni de la ligand care cedează electronii de la elementul cel mai electronegativ din structura sa.

În urma acestui schimb de electroni ionul central și ligandul se asociază prin legături coordinative.

Combinațiile complexe pot fi clasificate în:

◆ combinații complexe de adiție ce rezultă din unirea moleculelor ionizabile sau neionizabile:

$$\text{Ex:} \quad HCl + AuCl_3 \rightleftarrows H[AuCl_4]$$

◆ combinații complexe de interpunere în care între cationul și anionul unei sări se interpune ligandul:

$$CuSO_4 + NH_3 \rightleftarrows [Cu(NH_3)_4]SO_4$$

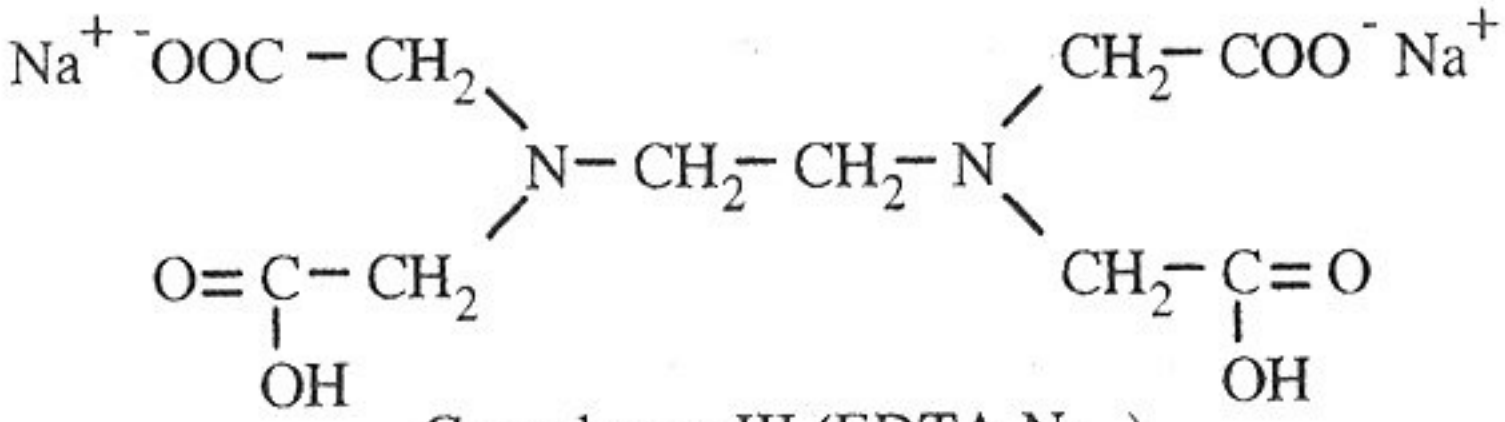
◆ combinații complexe interne (chelați) în care ionul central se leagă de liganzii organici care au două grupări funcționale printr-o legătură covalentă și una coordinativă formând cicluri.

Aceste combinații interne pot fi intens colorate sau incolore.

Liganzii organici folosiți frecvent la obținerea combinațiilor complexe interne sunt acizii aminopolicarboxilici, denumiți complexoni (I, II, III).

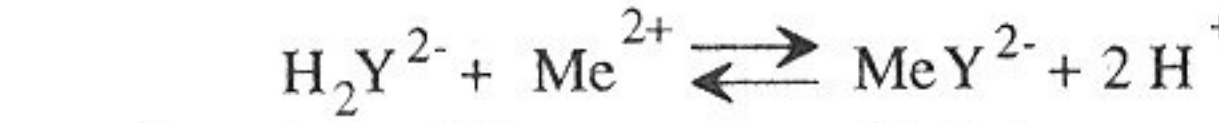
Combinațiile formate de complexoni și diferiți cationi divalenți (Ca^{2+}, Mg^{2+}) sau trivalenți (Al^{3+}) se numesc complexonați.

Cel mai folosit este complexonul III, sarea disodică a acidului etilendiaminotetraacetic, care are următoarea structură:



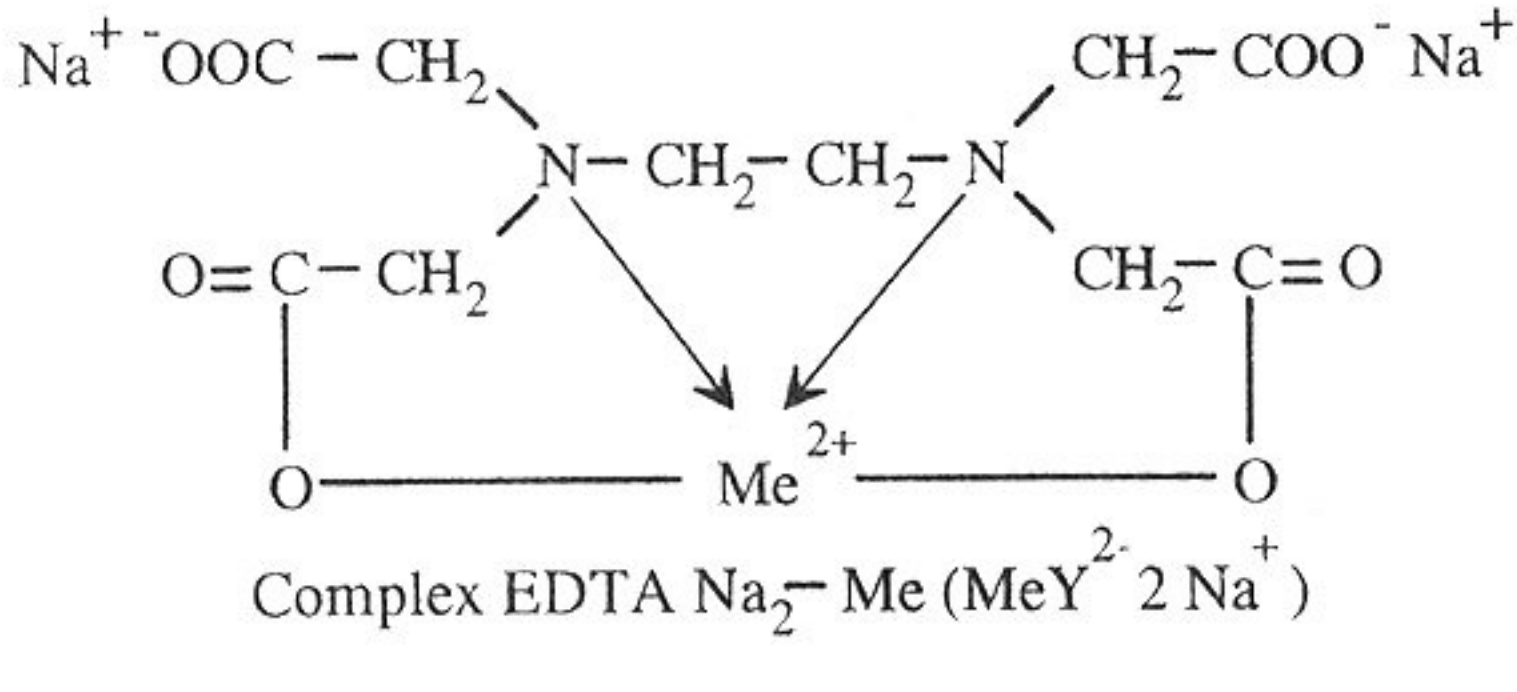
Complexon III ($EDTA\ Na_2$)

Reacția complexonului III cu un cation divalent (Me^{2+}) poate fi reprezentată astfel:



Complexon III Chelat

Structura chelatului format este reprezentată astfel:



Complex EDTA Na_2– Me ($MeY^{2-}\ 2\ Na^+$)

Indicatorii folosiți în titrarea complexometrică sunt coloranți organici care formează cu diferiți cationi combinații complexe a căror culoare diferă de cea inițială.

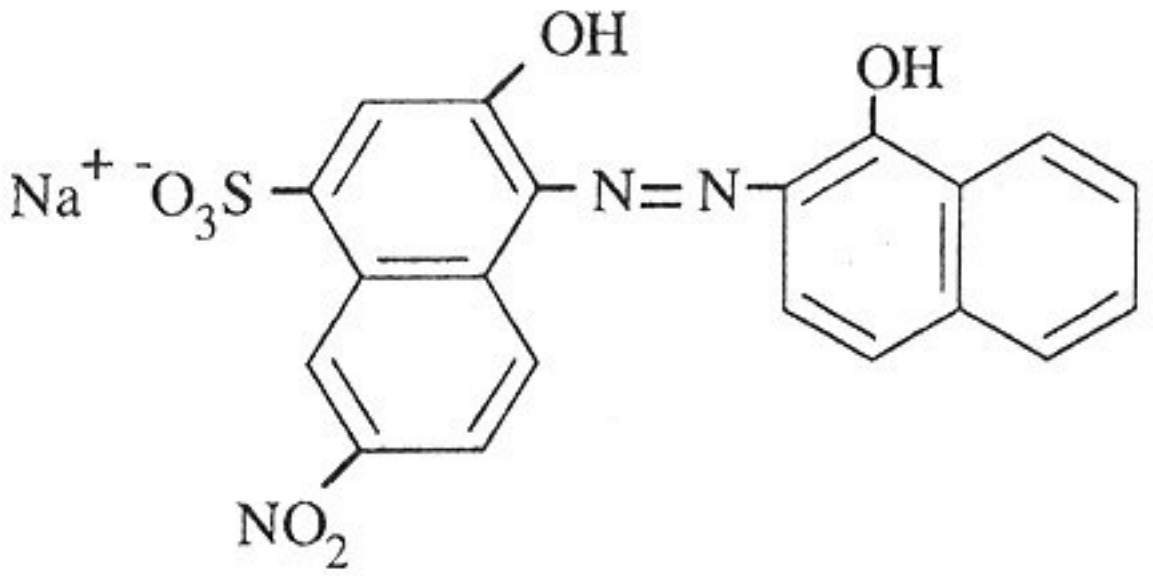
Indicatorii complexometrici, denumiți indicatori reactivi ai ionilor, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să formeze soluții colorate diferit;
- intensitatea culorii apărute să fie sesizabilă și pentru concentrații foarte mici ale complexonului;

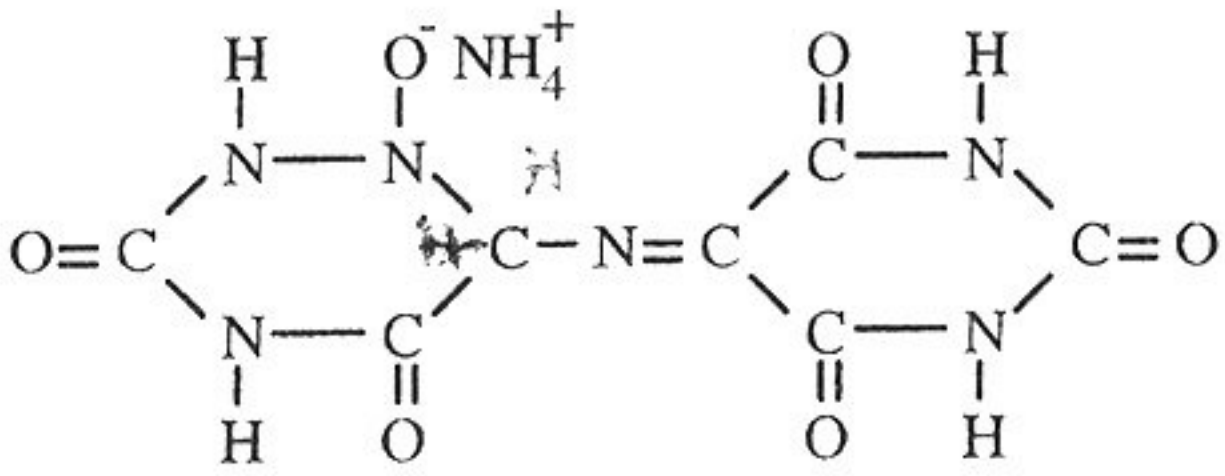
■ stabilitatea complexului indicator - ion titrat să fie mai mică în comparație cu cea a complexului complexon - ion titrat ($MeY^{2-}2Na^{+}$).

Cei mai folosiți indicatori sunt:

► **negru - eriocrom T** (erio T) - colorat în albastru:



► **murexid** (sarea de sodiu a acidului purpuric) de culoare violetă la pH puternic alcalin:



Datorită instabilității lor în soluție, la determinările complexometrice se recomandă folosirea pulberii de indicator amestecate cu NaCl.

II.5.1. PREPARAREA SOLUȚIEI DE COMPLEXON III 0,05 N.

Pentru titrările complexometrice se folosește soluția de sare disodică a acidului etilendiaminotetraacetic ($Na_2H_2Y \cdot 2H_2O$) de concentrație 0,05 n.

$$M_{EDTA\,NA_2 \cdot 2H_2O} = 372{,}24$$

Pentru 1000 cm^3 soluție este necesară cantitatea:

$$g = 0{,}05 \cdot 372{,}24 = 18{,}61 \text{ g EDTA } Na_2 \cdot 2H_2O$$

Tehnica de lucru:

► se cântăresc la balanța analitică 18,61 g complexon III de puritate analitică;

► se introduce substanța într-un balon cotat de 1000 cm^3;

► se aduce volumul total la 1000 cm^3 cu apă distilată;

► se omogenizează soluția și se transvazează într-un vas de material plastic, curat și uscat.

Titrul soluției de complexon III este:

$$T = \frac{18,61}{1000} = 0,01861 \text{ g/cm}^3$$

Dacă substanța nu are puritate avansată, se determină titrul cu ajutorul unor substanțe etalon: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCO_3$, $Mg(CH_3COO)_2$, etc.

II.6. pH-METRIE

II.6.1. DEFINIȚIA pH-ULUI. SCALA pH-ULUI

Noțiunea de pH este utilă pentru a caracteriza proprietățile acide sau bazice ale unor medii lichide. Înțelegerea acestei noțiuni este necesară și deoarece reacțiile biochimice care se petrec în organisme se desfășoară, datorită menținerii mediului biologic respectiv, între limite stricte ale valorii pH-ului, prin intervenția unor mecanisme de reglare foarte fine, funcționând ca o **constantă biologică** care asigură desfășurarea normală a proceselor biochimice care stau la baza tuturor manifestărilor vitale.

Determinarea pH-ului este foarte necesară și pentru că (practic) toate analizele enzimatice, precum și unele metode fizico - chimice, cum ar fi **electroforeza** în diferite variante și **cromatografia** de schimb ionic, se efectuează la valori fixe ale acestui parametru.

Înainte de a defini noțiunea de pH este necesar să facem câteva precizări:

- cantitatea totală de acid pe care o conține o soluție și care se poate determina prin titrarea cu o bază reprezintă **aciditatea totală;**
- fracțiunea ionizată din acidul respectiv reprezintă **aciditatea actuală** sau pH-ul soluției;
- fracțiunea de acid care inițial nu se află ionizată, dar care ionizează în cursul titrării, reprezintă **aciditatea potențială**. Rezultă deci:

aciditatea totală = aciditatea actuală + aciditatea potențială

Ionizarea fracțiunii neionizate în cursul titrării are loc pentru a restabili echilibrul reacției:

$$AH + HOH \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$$

tulburat de reacția care are loc la adăugarea bazei:

$$HO^- + H_3O^+ \rightleftharpoons 2\,H_2O$$

Conform definiției date de Sörensen, pH-ul reprezintă logaritmul zecimal cu semn schimbat al concentrației ionilor de H^+ și se exprimă prin relația următoare:

$$pH = - \log [H^+] \qquad (1)$$

Pentru a defini această noțiune trebuie să luăm în considerare produsul ionic al apei. În condiții deosebite de puritate, în absența aerului și în vase de platină, apa distilată are o conductibilitate electrică foarte mică, dar constantă, datorită ionilor rezultați prin disocierea sa:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + HO^- \qquad (2)$$

În realitate, ionul de hidrogen este asociat cu o moleculă de apă formând ionul de hidroniu (H_3O^+) conform reacției:

$$H^+ + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ \qquad (3)$$

Rezultă că disocierea apei poate fi formulată și prin ecuația:

$$H_2O + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + HO^- \qquad (4)$$

Apa este un dizolvant autoprotolitic, datorită faptului că prin disocierea sa funcția acidă este conferită prin ionul de hidrogen (H^+), respectiv ionul de hidroniu (H_3O^+), iar funcția bazică prin ionul hidroxil (HO^-).

Aplicând legea echilibrului chimic (legea maselor) în cazul reacției de disociere a apei (2), rezultă relația:

$$K = \frac{[H^+][HO^-]}{[H_2O]} \qquad (5)$$

Concentrația moleculelor de apă nedisociate poate fi considerată constantă, deoarece ea nu variază semnificativ prin disocierea unui număr foarte mic de molecule.

$$[H^+][HO^-] = K[H_2O] = P_{H_2O} \qquad (6)$$

Constanta (P_{H_2O}) reprezintă **produsul ionic al apei** și este definit ca produsul dintre concentrațiile de echilibru ale ionilor rezultați din disocierea apei.

$$P_{H_2O} = [H^+][HO^-] \qquad (7)$$

Prin determinarea conductibilității electrice a apei pure la temperatura de +22ºC, s-a stabilit că produsul ionic al apei are valoarea $1 \cdot 10^{-14}$. Relația (7) poate fi exprimată astfel:

$$[H^+][HO^-] = P_{H_2O} = 1 \cdot 10^{-14} \text{ (ioni gram/l)}^2 \qquad (8)$$

Prin disocierea apei pure rezultă cei doi ioni în proporții egale, deci:

$$[H^+] = [HO^-] \qquad (9)$$

Înlocuind în relația (8), aceasta devine:

$$[H^+]^2 = [HO^-]^2 = P_{H_2O} = 1 \cdot 10^{-14} \text{ (ioni gram/l)}^2 \qquad (10)$$

Relația (10) se poate transforma astfel:

$$[H^+] = [HO^-] = \sqrt{P_{H_2O}} = \sqrt{1 \cdot 10^{--14}} = 1 \cdot 10^{-7} \quad \text{ioni gram/l} \qquad (11)$$

Prin urmare, în apa pură concentrația ionilor de hidrogen este egală cu cea a ionilor hidroxil, având valoarea de 10^{-7} ioni gram H^+, respectiv 10^{-7} ioni gram HO^- la litru (la temperatura de 22ºC). Dacă în relația (11) se înlocuiește definiția pH-ului (1), se va obține:

$$pH = 7 - \log 1 \qquad (12)$$

Se consideră valoarea pH = 7 reprezentând o soluție neutră, adică o soluție care conține un număr egal de ioni H^+ și ioni HO^-. Deoarece acești ioni sunt în număr egal în cazul disocierii apei pure, rezultă că apa este **neutră și amfoteră.**

În tabelul II.14. sunt prezentate principalele zone din scala pH-ului.

TABELUL II.14. SCALA pH-ului.

Reacția soluției	**$[H^+]$**	**$pH = - \log [H^+]$**
Soluții neutre	10^{-7}	7
Soluții acide	$> 10^{-7}$	< 7
Soluții bazice	$< 10^{-7}$	> 7

Determinarea pH-ului unei soluții poate fi efectuată prin metode colorimetrice sau electrometrice. În cele ce urmează prezentăm un tabel cu pH-ul unor lichide biologice (după Lehninger, 1977).

Valorile pH-ului sunt cuprinse între 0 -14 și se poate reprezenta astfel scala pH-ului:

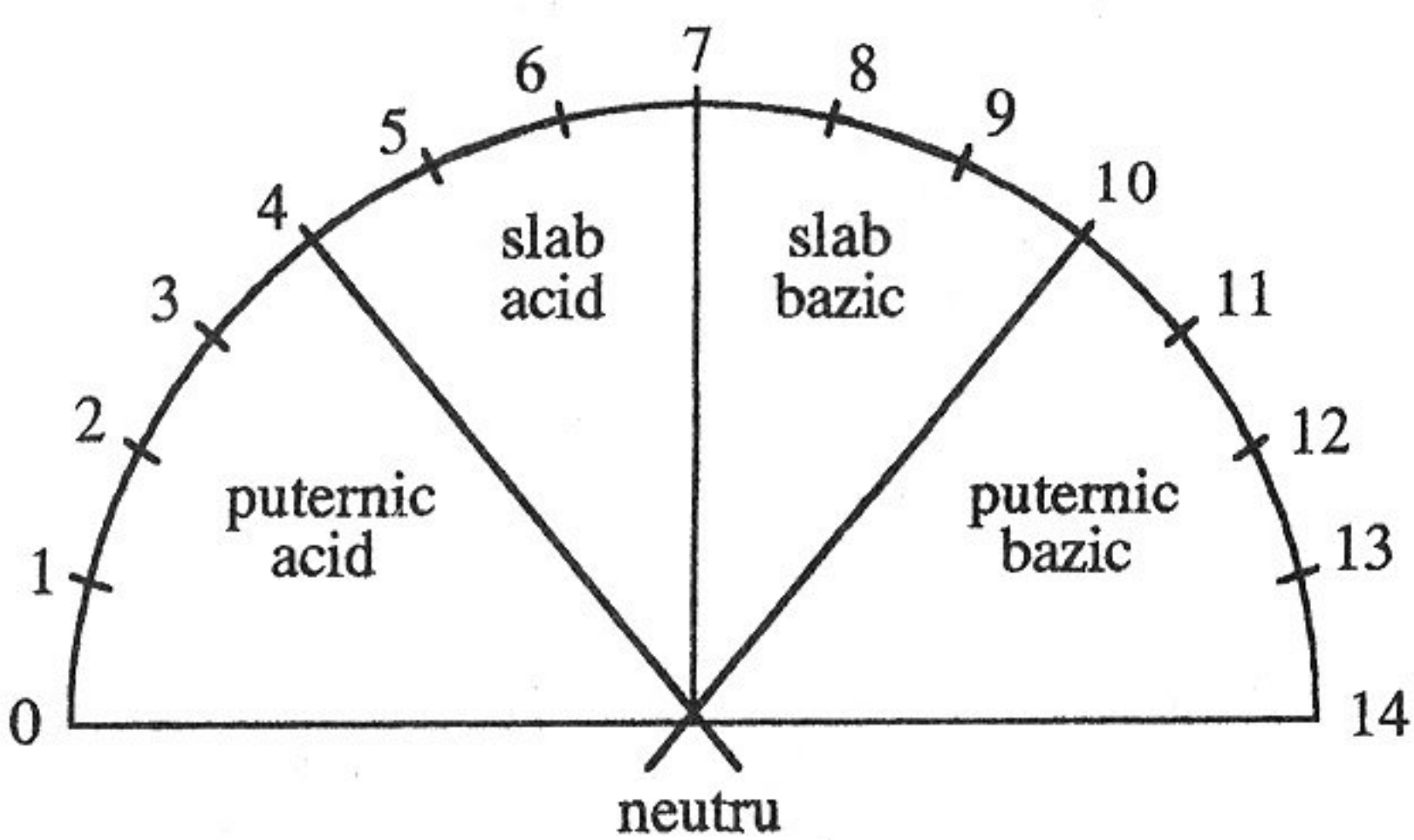


Fig.II.2. **Scala pH-ului.**

TABELUL II.15. pH-ul UNOR LICHIDE DE INTERES BIOLOGIC.

Fluid	pH	Fluid	pH
Ser uman	7,4	Salivă	6,35 - 6,85
Lichide interstițiale	7,4	Urină umană	5,2 - 8,4
Lichide intracelulare		Urină de rumegător	7,8 - 8,6
- musculare	6,1	Lapte de vacă	6,6
- hepatice	6,9	Suc de tomate	4,3
Sucul gastric	1,2 - 3,0	Suc de grapefruit	3,2
Sucul pancreatic	7,8 - 8,0	Suc de lămâie	2,3

II.6.2. INDICATORI DE pH. MECANISM DE ACȚIUNE

Indicatorii de pH, denumiți și **indicatori acido-bazici**, sunt utilizați în scopul determinării pH-ului unor soluții incolore sau slab colorate, ca și pentru stabilirea punctului de echivalență în reacțiile de neutralizare.

Indicatorii de pH sunt fără excepție coloranți organici și anume acizi sau baze organice foarte slabe care își modifică culoarea în funcție de concentrația ionilor de H^+ sau de HO^-, respectiv de pH-ul unei anumite soluții.

Indicatorii de pH acido - bazici (HInd, IndOH) disociază după schemele:

$$\underset{\text{culoare în mediu acid}}{HInd} \rightleftharpoons \underset{\text{culoare în mediu bazic}}{H^+ + Ind^-}$$

$$\underset{\text{culoare în mediu bazic}}{Ind - OH} \rightleftharpoons \underset{\text{culoare în mediu acid}}{HO^- + Ind^+}$$

Dacă la o soluție de indicator se adaugă mici volume din soluția unui acid sau a unei baze are loc o schimbare (virare) treptată a culorii soluției într-un interval de pH caracteristic fiecărui indicator.

Schimbarea culorii indicatorului nu se produce la un anumit pH strict, ci într-un anumit interval, denumit **„interval de viraj”,** în afara căruia nu se mai observă o schimbare a culorii indicatorului. În intervalul de viraj, care cuprinde în general două unități de pH, indicatorul prezintă o colorație progresiv variabilă.

Fenolftaleina este un indicator care se comportă ca un acid slab fiind incolor la pH < 8,0. Dacă la o soluție de fenolftaleină se adaugă volume mici din soluția unei baze, apare o colorație **roz** care se intensifică până la **roșu-carmin,** când pH-ul atinge valoarea de 9,8. Prin urmare, fenolftaleina prezintă un interval de viraj cuprins între 8,2 - 10,0.

Deci fiecare indicator mai poate fi caracterizat și prin culorile pe care le are la pH-uri mai mari sau mai mici decât intervalul de viraj.

În tabelul II.16. sunt prezentați o parte din indicatorii cei mai utilizați și schimbările de culoare pe care le prezintă.

Din analiza tabelului II.16. se constată că există indicatori cu interval de viraj în zona pH-urilor puternic acide, alții în zona pH-urilor vecine neutralității și alții în zona pH-urilor bazice, acoperindu-se astfel toată scala pH-ului.

Tot din tabelul II.16. se poate observa că unii indicatori sunt **unicolori** (fenolftaleina, nitramina), dar cei mai mulți sunt **bicolori.**

TABELUL II.16 INDICATORI ȘI INTERVALELE LOR DE VIRAJ.

Indicatorul	Culoare mediu acid	Culoare mediu alcalin	Intervalul de viraj (pH)
Albastru de metil	roșu	galben	1,2 - 2,8
Tropeolina 00	roșu	galben	1,3 - 3,2
Albastru de brom fenol	galben	roșu purpuriu	3,0 - 4,6
Metil orange	roșu	galben	3,1 - 4,4
Roșu de metil	roșu	galben	4,4 - 6,2
Albastru de brom timol	galben	albastru	6,2 - 7,6
Acid rozolic	galben	roșu	6,8 - 8,0
Roșu de crezol	galben	roșu	7,2 - 8,6
Turnesol	roșu	albastru	5,0 - 8,0
Fenolftaleina	incolor	roșu	8,2 - 10,0
Timolftaleina	incolor	albastru	9,4 - 10,6
Galben de alizarină	galben	violet	10,0 - 12,0
Tropeolina 0	galben	orange	11,0 - 13,0
Nitramina	incolor	portocaliu brun	11,0 - 13,0

Prin amestecarea unor indicatori în anumite proporții (**indicatori micști**), se poate obține o schimbare mai netă a culorii într-un interval de pH îngust, mărindu-se mult exactitatea titrării.

Există indicatori ale căror intervale de viraj acoperă întreaga scală de pH - **indicatori universali.** Acești indicatori rezultă prin combinarea în diferite proporții a unor indicatori din tabelul II.16.: indicator Bogen pH (1 - 10) și indicator Kolthoff pH (2 - 11).

I **Indicatorul universal Bogen** este obținut astfel:

- 0,1 g fenolftaleină;
- 0,2 g roșu de metil;
- 0,4 g dimetilaminobenzen;
- 0,5 g albastru de bromtimol;
- 500 ml alcool etilic 95%;
- se adaugă NaOH 0,1 n până se obține o culoare galbenă (pH = 6).

II **Indicatorul universal Kolthoff** se prepară prin amestecarea soluțiilor alcoolice ale următorilor indicatori:

- 15 ml galben de metil 0,1%;
- 20 ml albastru de bromtimol 0,1%;
- 20 ml timolftaleină 0,1%.
- 5 ml roșu de metil 0,1%;
- 20 ml fenolftaleină 0,1%;

Determinarea aproximativă a pH-ului unei soluții se face adăugând 0,1 ml indicator la 10 ml soluție.

În tabelul II.17. este prezentată variația culorilor pe scala pH-ului în cazul celor doi indicatori universali.

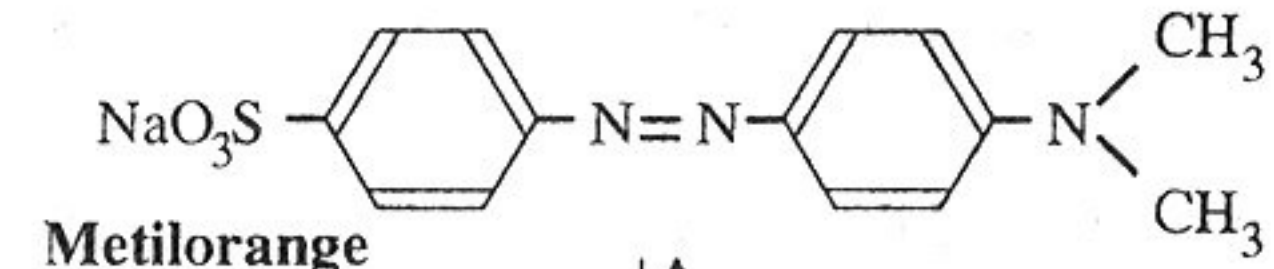
TABELUL II.17. VARIAȚIA CULORILOR INDICATORILOR UNIVERSALI

pH	Indicator Bogen	pH	Indicator Kolthoff
1	roșu cireșiu	1	-
2	roz	2	roz
3	roșu portocaliu	3	portocaliu roșiatic
4	portocaliu roșiatic	4	portocaliu
5	portocaliu	5	galben portocaliu
6	galben	6	galben citrin
7	galben verzui	7	galben verzui
8	verde	8	verde
9	verde albăstrui	9	verde albăstrui
10	albastru	10	violet
11	-	11	roșu violet

Prin îmbibarea unor fâșii de hârtie de filtru cu indicatori s-au confecționat hârtii de indicator universal, furnizate de diverse firme (Merck, Ames, etc.). Hârtiile indicator se utilizează pentru determinarea aproximativă a pH-ului.

Mecanism de acțiune. Modificarea culorii indicatorilor în funcție de pH se bazează pe **teoria cromoforionică**, conform căreia schimbarea de culoare este determinată de anumite modificări în structura moleculei indicatorului.

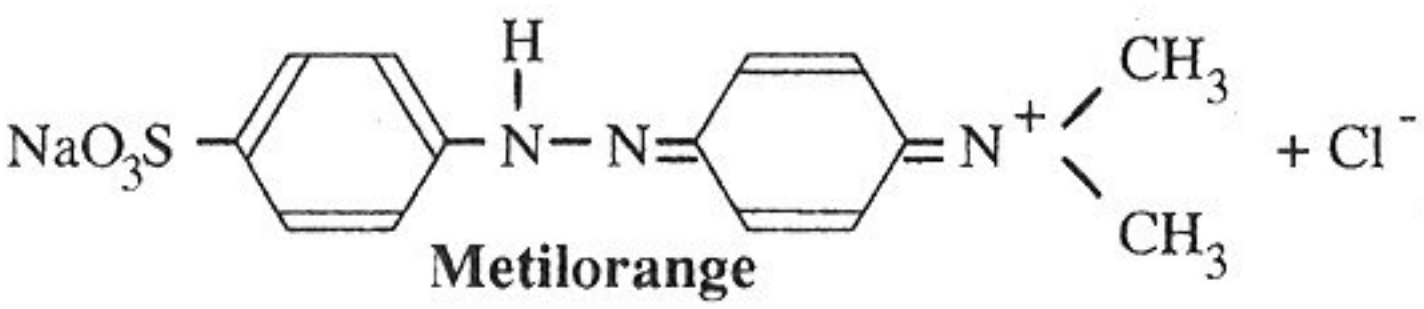
În cazul indicatorului **metilorange**, virarea culorii se datorează unei modificări structurale de tipul:



Metilorange

-forma azoidă-

galbenă

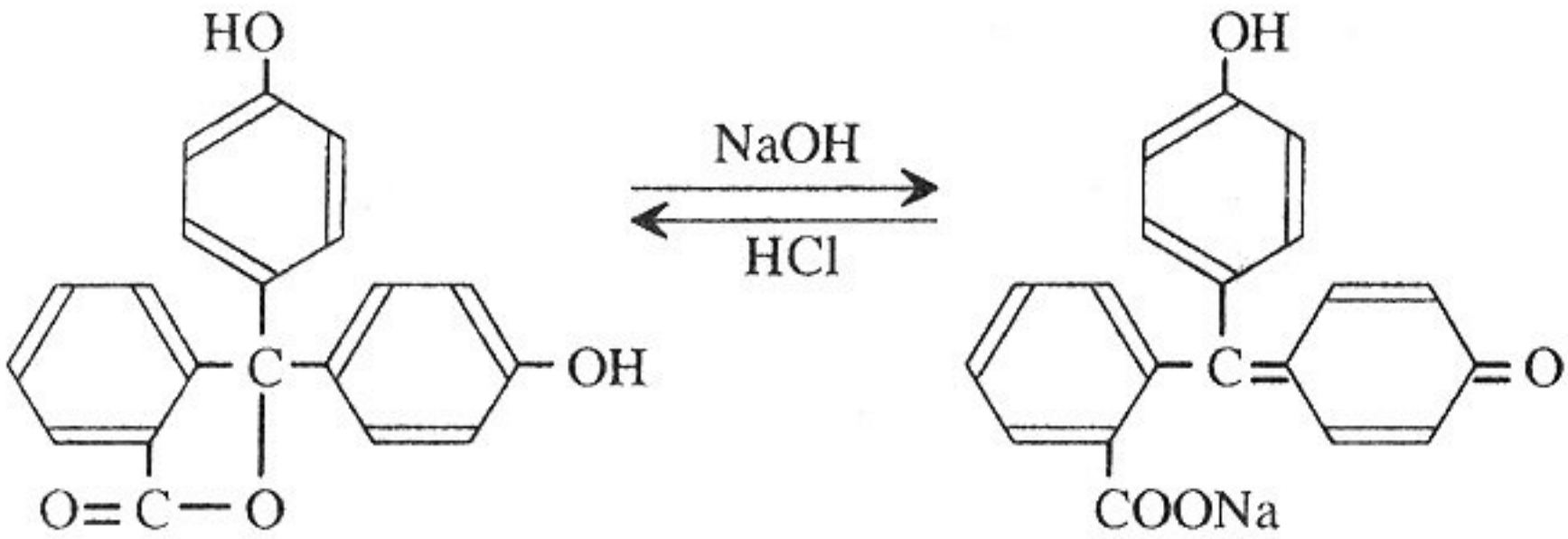


Metilorange

-forma chinoidă-

roșie

În cazul **fenolftaleinei,** forma **lactoidă** este **incoloră**, iar la un pH alcalin se transformă în forma **chinoidă** de culoare roșie.



Fenolftaleina

-forma lactoidă-

-incoloră-

Fenolftaleina

-forma chinoidă-

-roșie-

II.6.3. DETERMINAREA EXPERIMENTALĂ A PH-ULUI

În funcție de precizia cu care dorim să determinăm pH-ul, se utilizează două metode: metoda **colorimetrică** și metoda **electrometrică**.

Pentru necesități uzuale se utilizează frecvent hârtie indicator furnizată de diverse firme.

II.6.3.1. METODA COLORIMETRICĂ GUILLAUMIN

Principiul metodei. Indicatorii au proprietatea de a-și modifica culoarea în funcție de pH-ul soluției sau mediului biologic în care sunt introduși. Determinarea pH-ului urinar se recomandă să se facă în urina proaspăt emisă sau conservată sub toluen și păstrată la rece pentru a se evita infectarea ei.

Reactivi. Reactivul Guillaumin este format din amestecul următorilor indicatori:

- roșu de metil 0,06 g;
- albastru de brom timol 0,20 g;
- hidroxid de sodiu n/20 10 ml.

Substanțele de mai sus se amestecă bine într-un mojar, după care se transferă cantitativ într-un balon cotat de 500 ml, se adaugă apă distilată, se agită și apoi se aduce la cotă cu apă distilată.

Tehnica de lucru. Într-o eprubetă se pipetează 5 ml urină diluată 1/5 cu apă distilată. Se adaugă 5 picături reactiv Guillaumin, se agită și se observă culoarea rezultată.

TABELUL II.18. RELAȚIA ÎNTRE CULOAREA REACTIVULUI GUILLAUMIN ȘI pH.

Culoarea	pH	Culoarea	pH
• roșie	4,6	■ verde galbenă	6,2
• roșie intens	5	■ verde	6,6
• roșie gălbuie	5,4	■ verde albastră	7
• galbenă	5,8	■ albastră	7,4

II.6.3.2. DETERMINAREA PH-ULUI URINAR CU AJUTORUL HÂRTIEI INDICATOR UNIVERSAL

Aceasta este o metodă simplă, comodă și suficient de precisă pentru cerințele clinice. Hârtia indicatoare de pH se prezintă fie sub forma unor carnete pliante, fie sub forma unor discuri închise într-o

cutie din material plastic pe al cărei capac sunt indicate nuanțele de culori etalon corespunzătoare diferitelor valori de pH.

În funcție de sensibilitate și de domeniul de pH pe care-l acoperă, hârtiile indicatoare de pH sunt de două tipuri:

◆ hârtie indicatoare cu **macrodiviziuni** care acoperă domeniul de pH cuprins între 1-14, indicând valoarea pH-ului unitate cu unitate;

◆ hârtie indicatoare cu **microdiviziuni,** care cuprinde numai anumite domenii restrânse de pH (1 - 5), (6 - 8), (8 - 10), precizând valoarea pH-ului cu diferențe de 0,2 unități.

Tehnica de lucru.

► dintr-o bandă de hârtie indicatoare de pH se decupează cu o foarfecă mai multe porțiuni mici ;

► pe fiecare porțiune de hârtie indicatoare, prinsă de un colț cu o pensetă, se depune cu o pipetă o picătură de urină proaspăt emisă;

► se lasă în contact hârtia indicatoare cu picătura de urină timp de câteva secunde;

► se compară culoarea porțiunii de hârtie indicatoare cu culorile etalon indicate pe scala de pH;

► se stabilește corespondența dintre culoarea rezultată și culoarea similară de pe scala etalon;

► se citește valoarea pH-ului corespunzătoare culorii de pe scala etalon.

II.6.3.3. METODA ELECTROMETRICĂ

Metoda are la bază determinarea diferenței de potențial, utilizându-se un electrod de referință (calomel, Hg_2Cl_2) și un electrod de sticlă sau de hidrogen (de măsură). Se determină diferența de potențial într-o soluție tampon de pH cunoscut și, ulterior, în proba necunoscută. Valorile determinate se folosesc pentru calculul pH-ului pe baza definiției operaționale:

$$pH_x = pH_S + \frac{(\varepsilon_x - \varepsilon_S)\cdot F}{RT\cdot 2{,}303}$$, unde:

pH_x = pH-ul probei de analizat;
pH_s = pH-ul soluției standard;
ε_x = t.e.m. a celulei cu proba de analizat;
ε_s = t.e.m. a celulei cu soluție standard;
R = constanta universală a gazelor (8,31 J/K/mol);
T = temperatura absolută în °K (T = t (°C)·273,15);
F = constanta lui Faraday (96500 C/mol).

În prezent, măsurarea pH-ului în laboratoare sau în industrie se efectuează, aproape exclusiv, folosind pH-metrele, aparate sensibile care arată cu mare precizie valoarea pH-ului.

II.7. SOLUȚII TAMPON

II.7.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Desfășurarea reacțiilor chimice și biochimice este condiționată de concentrația ionilor de hidrogen din mediu. Așadar, marea majoritate a reacțiilor chimice „**in vitro**", ca și a reacțiilor biochimice „**in vivo**" se desfășoară la valori riguros definite ale pH-ului.

Homeostazia organismelor presupune și menținerea echilibrului acido - bazic în condiții compatibile cu viața. Organismul viu posedă mecanisme de reglare fine ce se opun oricăror variații de pH care ar tinde să modifice acest echilibru, prin intervenția unor sisteme tampon, cu rol de a menține pH-ul în limitele unor valori, care permit desfășurarea optimă a proceselor vitale.

Soluțiile tampon reprezintă un amestec în echilibru și în anumite proporții între un acid slab și baza sa conjugată, care la adăugarea unor mici cantități de substanțe cu caracter acid sau bazic, are proprietatea de a se opune modificărilor de pH, valoarea pH-ului fiind menținută între limite constante.

Soluțiile tampon prezintă următoarele caracteristici:

- au o concentrație a ionilor de hidrogen constantă;

- creează într-o soluție dată o anumită concentrație de ioni de hidrogen;
- mențin această concentrație în anumite limite;
- se opun unor variații bruște ale pH-ului unei soluții.

Procesul prin care soluțiile tampon mențin pH-ul unei soluții la o valoare constantă este denumit **tamponare.**

II.7.2. MECANISM DE ACȚIUNE

Orice substanță care poate să **doneze** un **proton** (H^+) este un **acid**, iar o **bază** este o substanță care poate să **accepte** un **proton** (H^+), conform teoriei lui **Brönsted**.

Un acid (HA) poate furniza un proton conform ecuației:

$$\underset{\text{acid}}{HA} \rightleftharpoons \underset{\text{proton}}{H^+} + \underset{\text{bază}}{A^-}$$

Prezentată invers, ecuația poate caracteriza o bază:

$$A^- + H^+ \rightleftharpoons HA$$

Anionul A^- reprezintă baza conjugată, deoarece poate accepta un proton pentru a forma acidul HA. Exemple de acizi:

$$HCl \rightleftharpoons H^+ + Cl^-$$

$$CH_3COOH \rightleftharpoons H^+ + CH_3COO^-$$

$$NH_4^+ \rightleftharpoons H^+ + NH_3$$

Exemple de baze:

$$Cl^- + H^+ \rightleftharpoons HCl$$

$$CH_3-COO^- + H^+ \rightleftharpoons CH_3-COOH$$

$$NH_3 + H^+ \rightleftharpoons NH_4^+$$

Acțiunea de tamponare exercitată de o soluție tampon se realizează prin următoarele mecanisme:

► la adăugarea unui acid în anumite proporții, anionii aflați în soluția tampon formează cu ionii H^+ un acid slab disociat, astfel încât efectul acidului adăugat se neutralizează, iar pH-ul soluției rămâne practic nemodificat;

► la adăugarea unei mici cantități de bază, ionii H^+ ai acidului care se găsesc în soluția tampon formează cu ionii HO^- molecule de apă puțin disociate, prin care se neutralizează efectul bazei adăugate, pH-ul rămânând practic nemodificat.

Reducând până la esență, mecanismul de acțiune a soluțiilor tampon poate fi redat astfel pornind de la reacția generală:

$$\text{Acid} \rightleftharpoons \text{Bază conjugată} + H^+$$

► la adăugarea de acid (H^+) baza conjugată reacționează cu H^+, iar echilibrul se deplasează spre stânga (pH-ul nu se modifică);

► la adăugarea de bază (HO^-), acidul reacționează cu HO^-, iar echilibrul se deplasează spre dreapta (pH-ul nu se modifică).

Exemplul 1. Vom lua în considerare soluția tampon formată dintr-un acid slab (CH_3COOH) și sarea sa hidrolizabilă (CH_3COONa), care disociază astfel:

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3-COO^- + H^+$$

$$CH_3COONa \rightleftharpoons CH_3-COO^- + Na^+$$

Aplicând legea acțiunii maselor la disocierea acidului acetic, se obține relația:

$$\frac{[CH_3-COO^-][H^+]}{[CH_3COOH]} = K_{Acet} \qquad (1)$$

Concentrația ionilor de hidrogen va fi:

$$[H^+] = \frac{[CH_3-COOH]}{[CH_3-COO^-]} \cdot K_{Acet} \qquad (2)$$

Din relația (2) rezultă că valoarea concentrației ionilor de hidrogen este dată de raportul dintre concentrația moleculelor nedisociate de acid acetic și concentrația anionilor acidului acetic (CH_3COO^-).

În cazul în care soluției tampon i se adaugă un acid (HCl), ionii H^+ puși în libertate prin disocierea acestui acid vor reacționa spontan cu anionii CH_3COO^- și vor forma molecule nedisociate de acid acetic care este un acid slab.

$$H^+ + CH_3COO^- \rightleftarrows CH_3COOH \qquad (3)$$

Conform reacției de mai sus (3), echilibrul reacției (1) se restabilește, concentrația ionilor de hidrogen rămânând neschimbată, iar valoarea pH-ului nu se modifică.

Dacă soluției tampon i se adaugă NaOH, ionii HO^- rezultați prin disocierea bazei vor reacționa spontan cu rezerva de molecule de acid acetic existentă în soluție.

Acidul acetic care a rămas disponibil va disocia, furnizând protoni suplimentari care reacționează cu ionii HO^-, având ca rezultat molecule de apă nedisociate și sarea respectivă. În urma acestei reacții se restabilește echilibrul inițial conform reacției (1), iar valoarea pH-ului nu se modifică.

$$\begin{array}{ccc} CH_3-COOH & \rightleftarrows & CH_3-COO^- + H^+ \\ & & \downarrow Na^+ \quad \downarrow HO^- \\ & & CH_3-COONa \quad H_2O \end{array} \qquad (4)$$

Exemplul 2. Sistemul tampon fosfat reprezentat de reacția:

$$H_2PO_4^- \rightleftarrows HPO_4^{2-} + H^+ \qquad (5)$$

► la adăugarea de acid, HPO_4^{2-} reacționează cu H^+ pentru a forma un acid mai slab ($H_2PO_4^-$) , echilibrul deplasându-se spre stânga:

$$HPO_4^{2-} + H^+ \rightarrow H_2PO_4^- \qquad (6),$$

pH-ul soluției rămânând constant;

► la adăugarea de bază (HO^-), $H_2PO_4^-$ va reacționa cu HO^- pentru a forma H_2O:

$$H_2PO_4^- + HO^- \rightarrow HPO_4^{2-} + H_2O \qquad (7)$$

Echilibrul se deplasează spre dreapta, iar pH-ul soluției rămâne constant.

Exemplul 3. Fosfații reprezintă unul din sistemele tampon ale organismului uman.

Efectul unui acid (HA) mai puternic decât fosfatul monobazic B_2HPO_4 (B = Na sau K), acid prezent în sânge și care tinde să modifice pH-ul, va fi anihilat deoarece fosfatul bibazic din sânge va reacționa cu acidul (HA).

$$B_2HPO_4 + HA \rightarrow BH_2PO_4 + BA \qquad (8)$$

Conform reacției respective rezultă o sare neutră (BA) și fosfatul monobazic, care se vor opune modificării valorii pH-ului.

Prin acțiunea unei baze (BOH) asupra fosfatului monobazic (BH_2PO_4) existent în sânge se formează apă și fosfat bibazic (B_2HPO_4), iar valoarea pH-ului se va menține în limite fiziologice:

$$BH_2PO_4 + BOH \rightarrow B_2HPO_4 + H_2O \qquad (9)$$

Din analiza exemplelor de mai sus putem concluziona că **sistemele tampon** au proprietatea de a menține constantă concentrația ionilor de hidrogen, respectiv pH-ul, la adăugarea unor mici cantități de acid sau de bază.

Deci sistemele tampon sunt formate din două componente: o componentă acidă care se opune variațiilor de pH la adăugarea unei baze și o componentă bazică care se opune la variațiile de pH la adăugarea unui acid și de aceea, amestecurile care compun sistemele

tampon posedă o rezervă de aciditate sau bazicitate, reacționând amfoter.

În tabelul II.18. sunt prezentate câteva sisteme tampon utilizate în laboratorul clinic.

TABELUL II.18. **SISTEME TAMPON UTILIZATE ÎN LABORATORUL CLINIC.**

Sistemul tampon	Limite de pH	Sistemul tampon	Limite de pH
▪Glicocol - HCl	1,04 - 3,64	▪KH_2PO_4 - Na_2HPO_4	5,29 - 8,04
▪Citrat - HCl	1,04 - 4,96	▪Glicocol - NaOH	8,57 - 13,06
▪CH_3COONa - CH_3COOH	3,60 - 5,60	▪Tris* - HCl	6,80 - 9,60
▪Acid citric - citrat	3,00 - 6,20	▪Veronal sodic* - HCl	6,80 - 9,20
▪Citrat - NaOH	5,02 - 12,37	▪Veronal* - veronal sodic	7,00 - 8,90

Tris* - tris (hidroximetil) aminometan $(HO\text{-}CH_2)_3\text{-}C\text{-}NH_2$;

Veronal* - acid dietilbarbituric;

Veronal sodic* - dietilbarbiturat de sodiu.

II.7.3. SISTEME TAMPON DIN ORGANISMUL UMAN

Mec. biol. de acțiune a acid., ac.-b.

Pentru desfășurarea proceselor metabolice în condiții optime, echilibrul acido - bazic este menținut în limite restrânse și prin mecanisme fizico - chimice reprezentate de sistemele tampon umorale și celulare.

Mecanismele fizico - chimice cum sunt cele de tamponare, corelate cu cele fiziologice mențin pH-ul sanguin constant.

Sistemele tampon din sânge care dețin această proprietate își au sediul în plasmă și eritrocite.

În **plasmă** se cunosc sistemele:

- bicarbonat / acid carbonic ($MHCO_3$ / H_2CO_3);
- fosfat bibazic / fosfat monobazic (M_2HPO_4 / MH_2PO_4);
- proteinat bazic / proteinat acid (P_B / P_A).

În **eritrocite** sunt reprezentate de:

- bicarbonat / acid carbonic ($MHCO_3$ / H_2CO_3);

- ► fosfat bibazic / fosfat monobazic (M_2HPO_4 / MH_2PO_4);
- ► hemoglobinat bazic / hemoglobinat acid (Hb B / Hb A);
- ► oxihemoglobinat bazic / oxihemoglobinat acid (Hb O_2 B / Hb O_2 A).

unde M = metal alcalin; B = bazic; A = acid.

II.7.3.1. SISTEMUL TAMPON AL ACIDULUI CARBONIC

Sistemul tampon al bicarbonatului este cel mai important sistem tampon al sângelui și acționează atât în **plasmă**, cât și în **eritrocite**.

Dioxidul de carbon (CO_2), produs permanent de activitatea celulară, difuzează în sângele din capilarele tisulare și se hidratează, atât în plasmă, cât și în eritrocite, generând H_2CO_3 care disociază rapid în H^+ și HCO_3^-.

Acidul carbonic este un acid slab și deoarece anionul său are mare afinitate pentru H^+, va disocia puțin în mediul plasmatic și eritrocitar, eliberând cantități reduse de protoni (H^+).

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^- \qquad (1)$$

Aplicând legea acțiunii maselor reacției de ionizare a acidului carbonic, rezultă următoarea relație:

$$\frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = K_A \qquad (2)$$

K_A este constanta de disociere sau de ionizare a H_2CO_3, reprezentată de pH-ul la care jumătate din molecule sunt disociate în ioni.

Deoarece sângele conține în soluție o cantitate de CO_2 de peste 1000 de ori mai mare decât cantitatea de H_2CO_3 se poate înlocui H_2CO_3 cu P_{CO_2} .

$$\frac{[H^+][HCO_3^-]}{P_{CO_2}} = K_A \qquad (3)$$

Dacă vom logaritma relația (3), se obține:

$$\log \frac{[H^+][HCO_3^-]}{P_{CO_2}} = \log K_A \qquad (4)$$

$$\text{sau } \log [H^+] + \log \frac{[HCO_3^-]}{P_{CO_2}} = \log K_A \qquad (5)$$

Prin rearanjare, ecuația (5) devine:

$$\log [H^+] = \log K_A - \log \frac{[HCO_3^-]}{P_{CO_2}} \qquad (6)$$

Schimbând semnele întregii relații aceasta devine:

$$-\log [H^+] = -\log K_A + \log \frac{[HCO_3^-]}{P_{CO_2}} \qquad (7)$$

Înlocuind valorile: $-\log [H^+] = pH$ și $-\log K_A = pK$ în relația (7), se obține ecuația Henderson - Hasselbach:

$$pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{P_{CO_2}} \qquad (8)$$

Din ecuația de mai sus, rezultă că pH-ul sanguin depinde de valoarea raportului HCO_3^-/P_{CO_2} , denumit curent sistemul tampon al bicarbonaților.

Sistemul tampon al bicarbonaților deține o valoare fiziologică ridicată, deoarece ionul HCO_3^- se află în cantități mari în toate lichidele organismului; ionul HCO_3^- este cel mai bun acceptor de H^+, mai ales pentru că plămânii și rinichii pot elimina cu ușurință CO_2 și, respectiv

H^+ și HCO_3^- , adaptând eliminările în funcție de starea echilibrului acido - bazic.

În plasmă și lichidul extracelular raportul bicarbonat / acid carbonic este 20/1, iar pH-ul mediului are valoarea 7,4.

Dacă în sânge crește mult concentrația bicarbonatului sau scade concentrația acidului carbonic, pH-ul depășește valoarea normală (7,35 - 7,40) și apare starea de **alcaloză.** Dacă pH-ul scade sub limita inferioară (7,35), datorită condițiilor inverse prezentate mai sus, se declanșează starea de **acidoză**, situație întâlnită la diabetici.

II.7.3.2. SISTEMUL TAMPON AL PROTEINELOR

Acest sistem tampon care operează în celulele tuturor țesuturilor va opera și în **plasmă.**

Există proteine care funcționează ca anioni la pH-ul slab alcalin al mediului intern.

Anionii proteici constituie componenta acidă a sistemului (H - proteină) și tamponează local bazele tari, iar în combinație cu cationii metalelor alcaline (Na, K) formează componenta bazică (Na - proteină sau K - proteină), având capacitatea de a tampona acizii tari.

Mecanismul tamponării poate fi redat astfel:

$$HCl + Na\text{ - proteină} \rightarrow NaCl + H\text{ - proteină}$$

$$NaOH + H\text{ - proteină} \rightarrow H_2O + Na\text{ - proteină}$$

Din analiza reacțiilor de mai sus se constată că, prin tamponare, acidul și baza tare au trecut în produși neutri (NaCl, H_2O), iar componentele sistemului s-au transformat una în cealaltă.

Fiecare din ele prezintă aciditate sau bazicitate moderată, astfel încât pH-ul mediului nu este afectat.

Proteinele acționează ca sistem tampon, deoarece aminoacizii care intră în structura lor funcționează ca electroliți amfoteri, putându-se comporta ca acizi sau ca baze, pentru că posedă grupări libere atât carboxilice, cât și aminice.

Grupările aminice (-NH_2) acționează ca baze, tamponând H^+ conform reacției:

$$R-NH_2+H^+ \underset{\leftarrow}{\rightarrow} R-NH_3^+$$

Grupările carboxil (-COOH) se comportă ca acizi, eliberând în mediul alcalin H^+ și formând anioni (- COO^-), conform reacției:

$$R-COOH + HO^- \rightleftharpoons R-COO^- + HOH$$

Capacitatea de tamponare a proteinelor plasmatice este mult mai redusă decât aceea a hemoglobinei, datorită atât concentrației lor mai reduse (un litru de sânge conține 60 - 80 g proteine plasmatice și 150 g Hb), cât mai ales puterii mai scăzute de tamponare (1 g Hb O_2 tamponează 0,183 mEq H^+, în timp ce 1 g proteine plasmatice numai 0,11 mEq H^+).

II.7.3.3. SISTEMUL TAMPON AL HEMOGLOBINEI

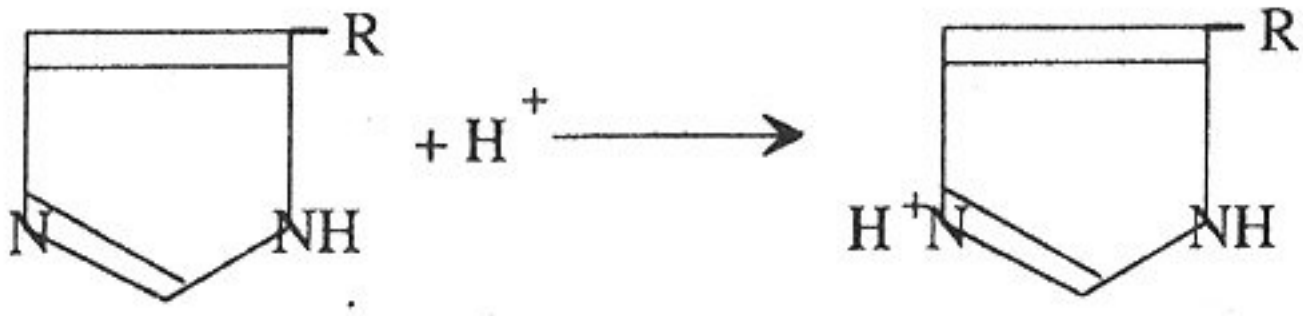
Hemoglobina intră în constituția a două sisteme tampon:

- hemoglobină acidă Hb H / hemoglobinat de potasiu Hb K (Hb H / Hb K);
- oxihemoglobină acidă HbO_2 H / oxihemoglobinat de potasiu HbO_2 K (HbO_2 H / HbO_2 K).

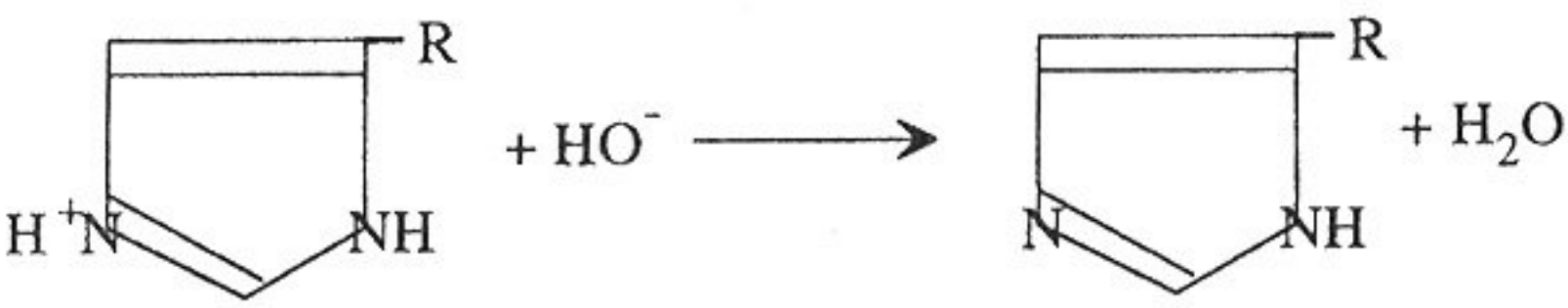
Ambele sisteme își pot exercita acțiunea tampon datorită faptului că hemoglobina cuprinde în partea sa proteică (globina) un număr mare de resturi de **histidină** (aproximativ 10% din totalul aminoacizilor care o compun).

Nucleul imidazolic din constituția histidinei are capacitatea să accepte și să cedeze H^+ la unul din atomii de azot ai heterociclului:

➢ nucleul imidazolic funcționează ca bază în mediu acid:



➢ nucleul imidazolic funcționează ca acid în mediu bazic:



În cazul sistemelor din care face parte hemoglobina, reacțiile pot fi următoarele:

Hb H + KOH → Hb K + H_2O; Hb K + HCl → Hb H + KCl

Hb O_2H + KOH → Hb O_2K + H_2O; Hb O_2K + HCl → Hb O_2H + KCl

În urma tamponării, acidul tare și baza tare s-au transformat în produși neutri (apă și sare de potasiu), păstrându-se aciditatea și bazicitatea sistemului moderată, fără a fi afectat pH-ul mediului.

Deși cantitatea de Hb este doar de trei ori mai mare față de cea a proteinelor plasmatice, capacitatea de tamponare a sa este de șase ori mai mare, comparativ cu cea a unui volum similar de plasmă.

Hemoglobina redusă este un acid mai slab decât hemoglobina oxidată, având o capacitate de tamponare mai redusă, deoarece disocierea resturilor imidozalice din structura acesteia este limitată.

Deoxigenarea are ca efect reducerea acidității Hb, putând chiar să accepte H^+.

Aceste modificări explică rolul de transportor al CO_2 de la țesuturi la plămâni, pe care-l are hemoglobina, fără modificări ale pH-ului sanguin.

II.7.3.4. SISTEMUL TAMPON AL FOSFAȚILOR

Sistemul tampon al fosfaților are un rol mai puțin important în plasmă, fiind unul din sistemele tampon fundamentale ale **urinei**.

Acest sistem este alcătuit din două săruri:

- fosfat monohidrogenat (Na_2HPO_4 sau K_2HPO_4) care constituie componenta bazică a sistemului;
- fosfat dihidrogenat (NaH_2PO_4 sau KH_2PO_4) care constituie componenta acidă a sistemului.

La pH-ul fiziologic al plasmei (7,4), raportul HPO_4^{2-} /$H_2PO_4^-$ = 5/1.

Componenta **bazică** HPO_4^{2-} tamponează acizii fixând ionii H^+ eliberați de acid:

$$HPO_4^{2-} + H^+ \rightarrow H_2PO_4^-$$

Componenta **acidă** $H_2PO_4^-$, prin eliberare de protoni, neutralizează ionii HO^- ai bazelor:

$$H_2PO_4^- + HO^- \rightarrow H_2O + HPO_4^{2-}$$

Produșii rezultați în ambele cazuri sunt componentele sistemului care se convertesc una în cealaltă în timpul tamponării.

Sistemul tampon al fosfaților este activ în hematii și în celulele tubilor renali.

Fosfatul disodic este cel mai important sistem tampon urinar datorită constantei sale de disociere crescute (pK = 6,8), ceea ce situează zona optimă de acțiune la nivelul pH-ului urinar.

II.7.3.5. MECANISME BIOLOGICE DE MENȚINERE A ECHILIBRULUI ACIDO - BAZIC

În reglarea echilibrului acido - bazic, roluri importante dețin următoarele organe și țesuturi: rinichiul, aparatul respirator, tractul digestiv, pielea, ficatul și aparatul cardio - vascular.

Plămânii intervin în menținerea echilibrului acido - bazic prin eliminarea CO_2 provenit fie din respirația tisulară, fie din tamponarea acizilor organici nevolatili rezultați din metabolismul intermediar. Această eliminare este exacerbată, fiind de circa 20 de ori mai rapidă decât pătrunderea O_2. Orice reducere a eliminării prin permeabilitatea scăzută a membranei alveolocapilare sau prin scăderea mobilității toracice duce la acidoze gazoase.

Menținerea constantă a echilibrului acido - bazic în mediul intern se realizează prin **cooperarea** dintre **plămâni** și **rinichi.**

Plămânii au o rezervă apreciabilă de dioxid de carbon gazos pe care o pot modifica prin ritmul respirator.

Prin eliminarea unei cantități mai mari sau mai mici de dioxid de carbon, în funcție de frecvența și amplitudinea respirației, plămânii acționează direct și rapid asupra echilibrului acid carbonic/bicarbonat, din mediul intern.

Pe de altă parte, rinichii intervin asupra aceluiași echilibru acid carbonic / bicarbonat, restabilind concentrația sanguină a anionilor HCO_3^- prin reabsorbție și eliminând ionii H^+.

De precizat faptul că ionii H^+ nu sunt eliminați în totalitate ca atare în urină, ci rinichiul are capacitatea de a-i neutraliza în bună parte:

- fie prin înglobarea lor în ioni NH_4^+ după combinarea lor cu amoniac:

$$H^+ + NH_3 \rightarrow NH_4^+$$

- fie prin înglobarea lor în anioni $H_2PO_4^-$, conform reacției:

$$H^+ + HPO_4^{2-} \rightarrow H_2PO_4^-$$

Pielea participă la menținerea echilibrului acido - bazic, deoarece prin **transpirație** se elimină excesul de sarcini acide sau bazice, reprezentând echivalentul funcțional al unui rinichi.

Ficatul participă la menținerea echilibrului acido-bazic prin:

- funcția sa glucoformatoare;
- funcția de oxidare a acidului lactic;

➢ funcția de detoxifiere realizată prin sulfo și glucurono conjugarea cataboliților acizi.

Tubul digestiv reprezintă una din căile de eliminare a excesului de sarcini acide sau bazice.

Aparatul cardio-vascular își aduce contribuția în realizarea homeostaziei generale realizând omogenizarea și transportul sarcinilor în exces spre organele cu rol de eliminare.

II.7.3.6. TĂRIA IONICĂ

Desfășurarea unor procese biochimice din organismul uman este condiționată de concentrația ionilor din celule și din unele lichide biologice. Concentrația optimă a unei soluții conținând diferiți ioni se exprimă prin noțiunea de **tărie ionică** (μ).

Tăria ionică se definește ca semisuma produsului dintre concentrația molară a speciilor de ioni constituienți ai unei soluții și pătratul sarcinii electrostatice (valența) a acestor ioni. Tăria ionică se exprimă prin următoarea relație:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i c_i Z_i^2 \text{ , în care}$$

μ = tăria ionică;

c_i = concentrația molară a speciilor de ioni;

Z_i = sarcina electrostatică a speciilor de ioni **i**;

Σ = simbolul de însumare a tuturor termenilor cZ^2.

În tabelul II.19. sunt prezentate exemple pentru calculul tăriei ionice a următoarelor soluții:

- ► soluție de ser fiziologic NaCl 0,154 M;
- ► soluția tampon CH_3COONa 0,02 M + CH_3COOH 0,035M;
- ► soluția tampon KH_2PO_4 0,066 M + Na_2HPO_4 0,066 M;
- ► soluția tampon NaH_2PO_4 0,2 M + Na_2HPO_4 0,2 M.
- ► soluție Ringer NaCl 0,147 M + KCl 0,004 M + $CaCl_2$ 0,03 M;
- ► soluție Ringer-lactat NaCl 0,147 M + KCl 0,004 M +$CaCl_2$ 0,002 M + lactat de sodiu 0,031 M.

TABELUL II.19. MODELE DE CALCUL AL TĂRIEI IONICE.

Componentele soluției	Molaritate	Ioni	c	Z^2	cZ^2	Σ	μ=Σ/2
NaCl	0,154	Na^+	0,154·1	1	0,154	0,308	0,154
		Cl^-	0,154·1	1	0,154		
CH_3COONa	0,02	Na^+	0,02·1	1	0,02	0,11	0,055
CH_3COOH	0,035	CH_3COO^-	0,02·1	1	0,02		
		H^+	0,035·1	1	0,035		
		CH_3COO^-	0,035·1	1	0,035		
KH_2PO_4	0,066	K^+	0,066·1	1	0,066	0,528	0,264
Na_2HPO_4	0,066	$H_2PO^-_4$	0,066·1	1	0,066		
		2 Na^+	0,066·2	1	0,132		
		HPO^{2-}_4	0,066·1	4	0,264		
NaH_2PO_4	0,20	Na^+	0,200·1	1	0,200	1,6	0,8
Na_2HPO_4	0,20	$H_2PO^-_4$	0,200·1	1	0,200		
		2 Na^+	0,200·2	1	0,400		
		HPO^{2-}_4	0,200·1	4	0,800		
NaCl	0,147	Na^+	0,147·1	1	0,147	0,32	0,16
		Cl^-	0,147·1	1	0,147		
KCl	0,004	K^+	0,004·1	1	0,004		
		Cl	0,004·1	1	0,004		
$CaCl_2$	0,003	Ca^{2+}	0,003·1	4	0,012		
		2Cl	0,003·2	1	0,006		
NaCl	0,102	Na^+	0,102·1	1	0,102	0,286	0,143
		Cl^-	0,102·1	1	0,102		
KCl	0,004	K^+	0,004·1	1	0,004		
		Cl^-	0,004·1	1	0,004		
$CaCl_2$	0,002	Ca^{2+}	0,002·1	4	0,008		
		2Cl	0,002·2	1	0,004		
Lactat de sodiu	0,031	$C_3H_5O^-_3$	0,031·1	1	0,031		
		Na^+	0,031·1	1	0,031		

Forța ionică este o proprietate a unei soluții care exprimă atât concentrația ionilor, cât și natura acestora.

Activitatea celulară este dependentă de acești factori, iar valoarea optimă a forței ionice fiziologice este de aproximativ 0,15 (tăria ionică a serului fiziologic).

De aceea, în diversele determinări experimentale, este necesar ca țesuturile, respectiv celulele să fie introduse sau menținute în soluții cu concentrație ionică aproximativ echivalentă cu concentrația ionică a lichidului intracelular (citoplasma).

În caz contrar, se pot produce două efecte:

- fie celulele se vor **sparge,** datorită pătrunderii apei („umflare"), deoarece forța ionică a lichidului extracelular este mult mai mică decât cea a citoplasmei;
- fie celulele se vor **contracta**, datorită pierderii apei, deoarece forța ionică a lichidului extracelular este mult mai mare decât valoarea forței ionice fiziologice (0,154).

Cunoașterea cu exactitate a pH-ului și tăriei ionice pentru soluțiile tampon folosite la electroforeză este de o deosebită importanță, fiind alese în funcție de natura componentelor ce urmează a fi separate și de concentrația acestora.

Pentru electroforeza proteinelor se folosesc soluții tampon apoase cu valorile de pH între 3 și 10 și cu o tărie ionică cuprinsă între 0,01 și 0,3. Pentru alegerea acestora trebuie să se țină seama de domeniul de pH în care proteinele sunt stabile.

III. METODE FIZICO - CHIMICE UTILIZATE ÎN BIOCHIMIE

III.1. FOTOCOLORIMETRIA

Fotocolorimetria este una din cele mai utilizate metode fizico - chimice analitice al cărei principiu se bazează pe măsurarea, în condiții standard, a intensității culorii, intensitate care este proporțională, între anumite limite, cu concentrația componentului chimic ce se dozează.

Metodele fotometrice sunt simple, rapide și permit dozarea unor substanțe în prezența altora, fără a fi necesară o separare prealabilă a acestora.

Aceste metode au o largă aplicabilitate pentru dozarea unei game variate de **componente biochimice** din țesuturi și lichide biologice, care au proprietatea de a forma compuși colorați cu reactivi adecvați.

III.1.1. NOȚIUNI DE FOTOMETRIE

Prin termenul generic de **lumină** este desemnată energia radiantă constituită din fotoni, lungimi de undă (λ) care se încadrează în domeniul vizibil, precum și din lungimi de undă din domeniul invizibil (mai scurte și, respectiv, mai lungi) care încadrează domeniul vizibil. Astfel, lumina reprezintă un ansamblu complex de mai multe radiații luminoase de culori diferite, constituind un spectru de energie radiantă alcătuită din anumite lungimi de undă pe care ochiul le percepe ca „**lumină albă**". Dat fiind faptul că lumina se propagă prin unde, lungimea de undă reprezintă o mărime caracteristică ce se definește ca distanța dintre două maxime (piscuri). Această distanță, respectiv lungimea de undă (λ), se exprimă în nanometri:

$$\mathbf{1\ nm = 1 \cdot 10^{-9}\ m = 1 \cdot 10^{-6}\ mm}, \text{ sau:}$$

$$\mathbf{1\ nm = 1\ m\mu = 10\ Å\ (1\ angström = 10^{-8}\ cm)}$$

Energia radiantă se caracterizează, astfel, prin **lungimea sa de undă**. Marea majoritate a corpurilor posedă capacitatea de a absorbi selectiv energie radiantă de diferite lungimi de undă. Ochiul uman percepe radiațiile luminoase în domeniul λ = **400 - 760 nm**, radiații care constituie **domeniul vizibil** din spectru. Lungimile de undă mai mari de 760 nm constituie **domeniul infraroșu** (IR) care este invizibil, iar lungimile de undă mai mici de 400 nm constituie **domeniul ultraviolet** (UV) care, deasemenea, este invizibil. Reacțiile luminoase cu lungimi de undă din domeniul IR și UV pot fi măsurate cu aparate special construite denumite **spectrofotometre**.

Lumina obișnuită (policromatică), vizibilă cu ochiul liber (λ=400-760 nm) poate fi descompusă prin diferite procedee care utilizează prisme, rețele de difracție, în radiații luminoase cu lungimi de undă diferite pentru care corespund anumite culori din domeniul vizibil al spectrului.

Radiația compusă dintr-o singură lungime de undă sau dintr-un domeniu foarte îngust de lungimi de undă izolat din spectru poartă denumirea de **radiație monocromatică**.

În tabelul III.1. este redată relația între valorile λ ale diferitelor radiații luminoase și culoarea caracteristică pentru anumite domenii din spectrul luminii.

Majoritatea substanțelor chimice prezintă proprietatea de a absorbi selectiv energia radiantă de o anumită lungime de undă. Astfel, o soluție apare colorată datorită faptului că ea absoarbe toată lumina incidentă cu excepția aceleia pe care o percepe ochiul.

De exemplu, o soluție apare colorată în roșu deoarece absoarbe radiațiile albastre cu λ mai mici și, în consecință, va transmite numai radiația roșie cu λ cuprinse între 620 și 760 nm; prin analogie, o soluție colorată în albastru va absorbi radiații roșii cu λ mai mari și, în

consecință, va transmite numai radiația albastră cu λ cuprinsă între 440-500 nm.

TABELUL III.1. **DOMENIUL LUNGIMILOR DE UNDĂ DIN SPECTRUL LUMINII.**

λ (nm)	Domeniul din spectru	Culoarea observată	Culoarea complementară
180 - 400	U.V.	Invizibilă	-
400 - 440	Vizibil	Violetă	Galbenă - verde
440 - 500	Vizibil	Albastră	Galbenă
500 - 580	Vizibil	Verde	Roșie
580 - 600	Vizibil	Galbenă	Albastră
600 - 620	Vizibil	Portocalie	Albastră - violetă
620 - 760	Vizibil	Roșie	Verde - albastră
720 - 2000	I.R.	Invizibilă	-

Metodele colorimetrice măsoară absorbția din domeniul vizibil al spectrului luminii.

III.1.2. LEGILE COLORIMETRIEI

În general, dacă un fascicul de lumină cu intensitatea I_0 (lumină incidentă) cade asupra unui corp, o parte din intensitatea acestei lumini incidente este absorbită de către corp (I_a), iar o altă parte este transmisă (trece) prin corp (I_t), (se consideră reflexia neglijabilă), în conformitate cu relația:

$$I_0 = I_a + I_t \qquad (1)$$

Deoarece intensitatea luminii incidente (I_0), ca și a luminii transmise (I_t) pot fi determinate direct, rezultă că valoarea intensității luminii absorbite (I_a) se poate obține din relația:

$$I_a = I_0 - I_t \qquad (2)$$

Pe baza acestor date experimentale, Lambert-Beer a formulat una din legile colorimetriei, și anume:

Straturi de soluții cu aceeași grosime și care conțin dizolvată o anumită substanță absorb întotdeauna - în condiții experimentale identice - aceeași cantitate de lumină incidentă.

Între intensitatea luminii transmise (I_t) după trecerea printr-un strat de lichid, intensitatea luminii incidente (I_0) și grosimea stratului de lichid absorbant (d) există o relație care, în sistemul de logaritmi zecimali, se exprimă prin următoarea ecuație:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-kd}, \qquad (3)$$

în care k este coeficientul de extinție.

Prin coeficientul de extinție (k) se poate caracteriza capacitatea de absorbție a unei substanțe în soluție; acest coeficient depinde de natura substanței care absoarbe și de lungimea de undă a luminii incidente.

S-a demonstrat experimental că, în cazul absorbției luminii de către diferite soluții, coeficientul k este direct proporțional cu concentrația substanței absorbante:

$$k = \varepsilon \cdot c \qquad (4), \text{ în care:}$$

c = concentrația substanței

ε = coeficient care nu depinde de concentrație (este o constantă a substanței absorbante).

Înlocuind în ecuația (1) valoarea lui k din ecuația (2), se obține relația:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon cd} \qquad (5)$$

Această relație exprimă legea fundamentală a colorimetriei, cunoscută sub numele de legea Lambert - Beer. Ea este valabilă numai pentru lumină cu o anumită lungime de undă, adică pentru **lumina monocromatică.**

III.1.3. DEFINIREA UNOR NOȚIUNI UTILIZATE ÎN FOTOMETRIE (COLORIMETRIE)

Transmisia (T). Când lumina monocromatică incidentă cu intensitatea I_0 trece printr-un strat de lichid optic omogen, intensitatea luminii transmise (I_t) prin soluție va fi mai mică decât cea a luminii incidente (I_0), deoarece o parte din lumină a fost absorbită. Raportul $\frac{I_t}{I_0}$ definește mărimea denumită transmisie (T). Deci:

$$T = \frac{I_t}{I_0} = 10^{-\varepsilon cd} \qquad (6)$$

Absorbția (A). Reprezintă gradul în care intensitatea luminii incidente (I_0) este micșorată datorită proprietății absorbante a soluției pe care o parcurge radiația respectivă. Absorbția este dată de raportul:

$$A = \frac{I_0 - I_t}{I_0} \qquad (7)$$

Extincția (E) sau **densitatea optică (DO).** Reprezintă logaritmul mărimii reciproce (inverse) a transmisiei (T):

$$E = \lg \frac{1}{T} = \lg \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon cd \qquad (8)$$

$$\text{Deci: } E = \varepsilon cd \qquad (9)$$

Extincția este o mărime care se determină experimental și depinde de grosimea stratului de soluție colorată, **d**, care se analizează. La grosimi egale ale stratului de lichid, extincția este direct proporțională cu concentrația.

În condiții standardizate de lucru, ε și d sunt constante și, în consecință:

$$E = kc \qquad (10)$$

Rezultă, astfel, că extincția (E) este direct proporțională cu concentrația (c) unei substanțe dintr-o soluție colorată.

Relația dintre extincție și concentrație, exprimată prin relația (10), se reprezintă grafic printr-o dreaptă (fig.III.1.).

În cazul în care soluția analizată nu se supune legii Lambert - Beer, proporționalitatea directă dintre extincție și concentrație nu se mai păstrează și, în consecință, reprezentarea E = f(c) nu mai respectă forma unei drepte.

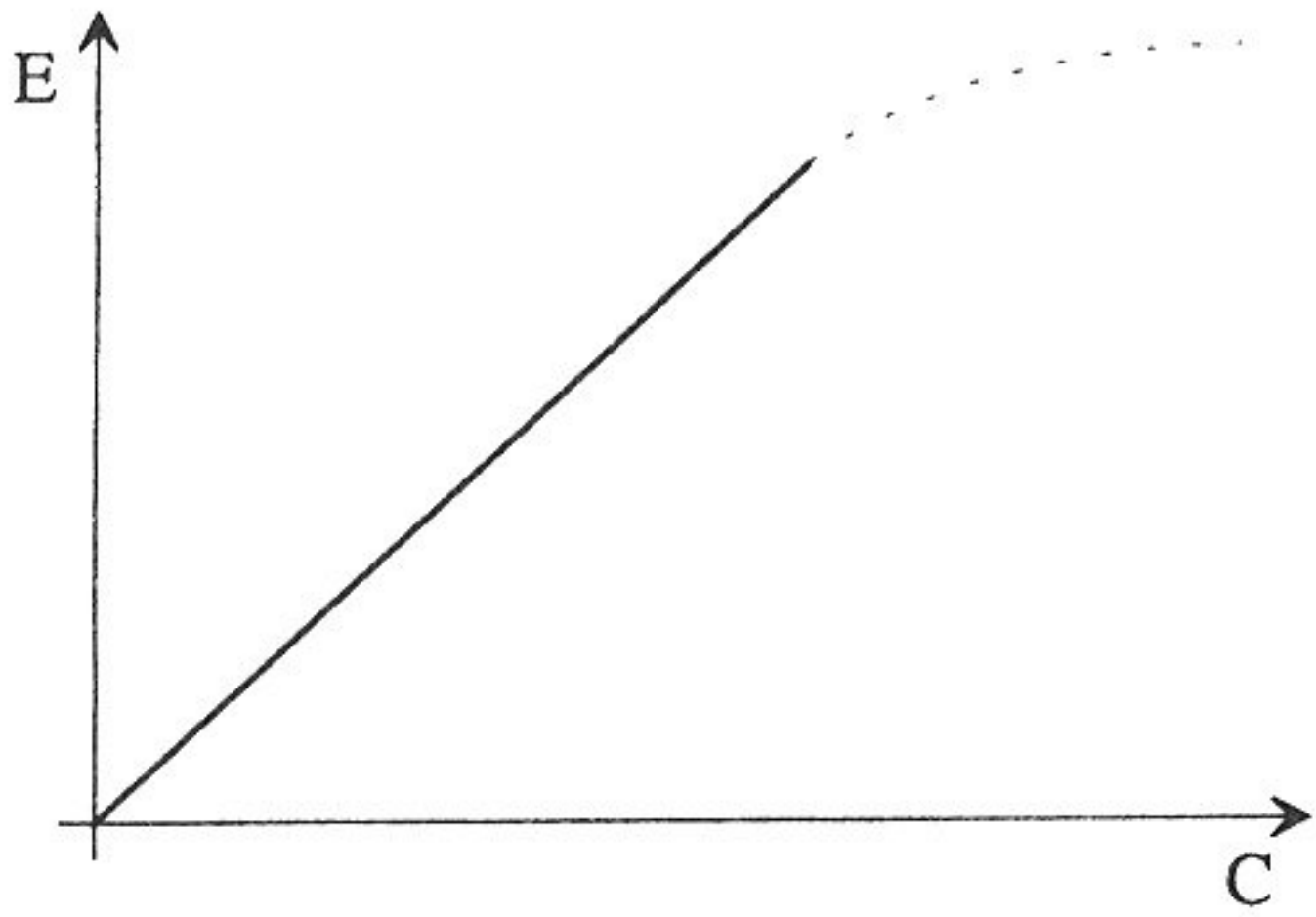


Fig.III.1. **Relația grafică dintre extincție (E) și concentrație (c).**

Din figura III.1. reiese că de la o anumită valoare a concentrației abaterea de la dreaptă **se aplatizează**, ceea ce indică faptul că pentru domeniul respectiv nu mai există o proporționalitate directă între extincție și concentrație.

Deci, relația **extincție – concentrație** este liniară (proporționalitate directă) numai într-un anumit domeniu de concentrație a substanței analizate, domeniu în care se aplică legea Lambert - Beer.

III.1.4. FORMULA GENERALĂ DE CALCUL ÎN ANALIZA FOTOCOLORIMETRICĂ

Din relația (10) rezultă valoarea lui k:

$$k = \frac{E}{c} \qquad (11)$$

Reiese, astfel, că pentru diferite concentrații (c) ale aceleiași soluții de analizat vor corespunde anumite extincții (E). Pentru un șir de determinări experimentale se obțin - în conformitate cu relația generală (10) - următoarele rapoarte:

$$\frac{E_1}{c_1} = \frac{E_2}{c_2} = \frac{E_3}{c_3} = \ldots = k \qquad (12)$$

sau pentru o pereche de rapoarte:

$$\frac{E_1}{c_1} = \frac{E_2}{c_2} \qquad (13)$$

Se deduce, astfel, că:

$$E_1 c_2 = E_2 c_1, \qquad (14),$$

de unde:

$$c_1 = \frac{E_1}{E_2} \cdot c_2 \qquad (15)$$

Pentru determinările experimentale se notează:

c_1 = concentrația necunoscută a probei care se analizează = c_p;

c_2 = concentrația cunoscută a unei soluții etalon de referință = c_{et};

E_1 = extincția probei de analizat, extincție care se determină experimental = E_p;

E_2 = extincția soluției etalon care se determină, de asemenea, experimental = E_{et}.

În aceste condiții și ținând seama de relația (15), formula generală de calcul care se aplică pentru determinările fotometrice (dozări) este următoarea:

$$c_p = \frac{E_p}{E_{et}} \cdot c_{et} \qquad (16)$$

III.1.5. SPECTROFOTOMETRUL TIP „SPEKOL"

Principiul de funcționare. Aparatul „SPEKOL" este un fotometru cu celulă fotoelectrică ce funcționează cu un singur fascicul de lumină; măsurarea extincției se efectuează prin metoda deviației: în calea radiației monocromatice se așează succesiv soluția de referință (martorul) și, ulterior, soluția conținând proba de analizat.

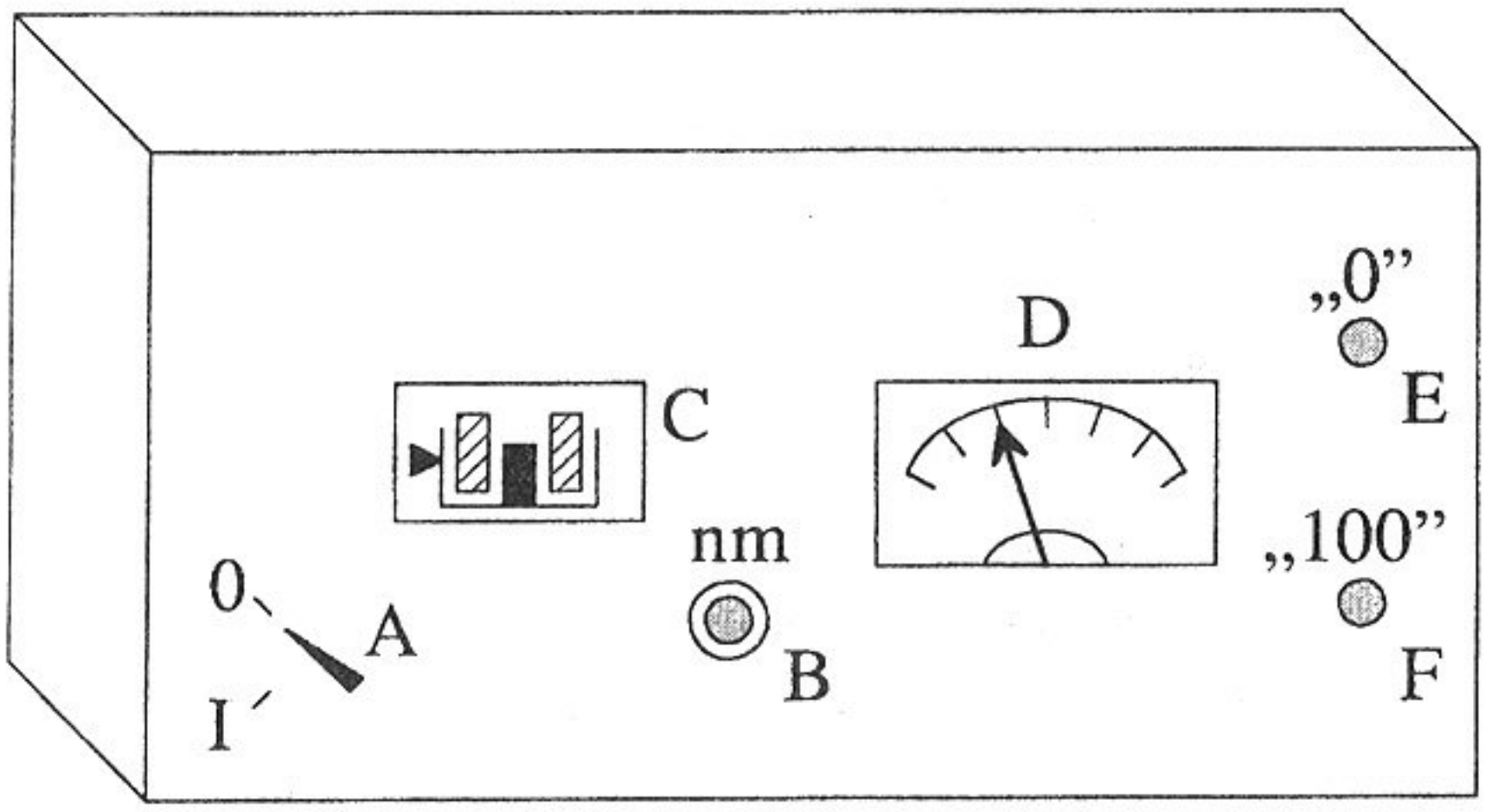


Fig.III.2. **Spectrofotometrul Spekol.**

Fasciculul de lumină emis de o lampă este descompus spectral cu ajutorul unei rețele de difracție, obținându-se radiații monocromatice de anumite lungimi de undă. Radiația monocromatică, stabilită în funcție de culoarea soluției de analizat, străbate stratul de lichid al probei ce se analizează și, ulterior, cade pe celula fotoelectrică, determinând astfel apariția unui fotocurent. Acest fotocurent exprimă gradul de transmisie a radiației care a străbătut soluția de analizat (respectiv proba martor) și se evaluează pe scala instrumentului de măsură în valori de extincție.

Extincțiile citite sunt proporționale cu intensitatea culorii soluției de analizat și deci cu concentrația componentului de dozat.

Manipularea aparatului și tehnica de lucru.

În figura III.2. este redată schema părții frontale a spectrofotometrului „SPEKOL" cu indicarea dispozitivelor respective.

Tehnica folosirii și determinării experimentale implică următoarea secvență de operații:

► conectarea aparatului la rețeaua de curent prin deschiderea comutatorului amplasat pe redresor (piesă anexă a aparatului);

► așezarea obturatorului A în poziția 0 (închis);

► alegerea lungimii de undă (λ = nm) indicată pentru efectuarea determinării, prin rotația butonului B;

► reglarea instrumentului de măsură D prin aducerea acului indicator în poziția 0 a scalei cu ajutorul butonului E;

► așezarea obturatorului A în poziția I (deschis), poziție care permite trecerea luminii monocromate în direcția cuvei cu soluție și a celulei fotoelectrice;

► reglarea instrumentului de măsură D, prin aducerea acului indicator în poziția 100 a scalei cu ajutorul butonului F;

► închiderea obturatorului A (poziția 0);

► introducerea cuvei cu soluția de referință (martor) într-unul din cele două compartimente ale suportului glisant C și deplasarea corespunzătoare a acestui suport, astfel încât cuva să fie amplasată exact în dreptul fantei prin care trece radiația luminoasă;

► deschiderea obturatorului (poziția I) și citirea valorii extincției pe scala respectivă (indicată cu D) a instrumentului de măsurare;

► introducerea cuvei conținând soluția de analizat în celălalt compartiment rămas liber al suportului glisant și amplasarea acestei cuve exact în dreptul fantei prin care trece radiația luminoasă;

► citirea valorii extincției pe scala respectivă (indicată cu D) a instrumentului de măsurare;

► închiderea obturatorului A (poziția 0) și deconectarea aparatului de la rețeaua de alimentare prin închiderea comutatorului amplasat pe redresor;

► se face diferența între extincția probei de analizat (E_p) și extincția probei martor (E_m); valoarea astfel obținută permite determinarea concentrației substanței de dozat utilizând fie metoda

curbei etalon, fie metoda comparației cu o soluție etalon de concentrație cunoscută.

Pentru efectuarea determinărilor fotocolorimetrice este necesară respectarea anumitor reguli:

- grosimea stratului de lichid trebuie astfel aleasă încât să se obțină valori ale extincției în domeniul 0,15 - 0,80;
- grosimea stratului se alege în funcție de intensitatea culorii obținute: pentru soluții puternic absorbante se utilizează cuve cu grosime mică a stratului de lichid (d = 0,5 cm), iar pentru soluții slab absorbante cuve cu grosime mai mare a stratului de lichid;

TABELUL III.2. PRINCIPALELE METODE COLORIMETRICE UTILIZATE ÎN LABORATORUL CLINIC.

Nr	Parametrul dozat	Denumirea metodei	Reactivul de culoare	Culoarea	Lungimea de undă
1	Proteine totale	Biuret Weiselbaum	$CuSO_4$+NaOH	albastru violet	570 nm
2	Lipide totale	Woodman-Price	Sulfo-fosfo vanilină	roșie vișinie	550 nm
3	Colesterol total	Rappaport	H_2SO_4+ anhidridă acetică	verde	660 nm
4	Triacilgliceroli	Gotfried-Rosenberg	Acetilacetonă	galbenă	425 nm
5	Glucoza	Hultman	O-toluidina	verde	635 nm
6	Creatinina	Folin-Wu	Acid picric	portocalie	530 nm
7	Uree	Kitamwa-Juki	Diacetil monoxima	galbenă	525 nm
8	Acid uric	Folin-Denis	Acid fosfo wolframic	albastră	710 nm
9	Bilirubina	Jendrasick	Acid sulfanilic	portocalie	600 nm
10	Fierul	Heilmeyer	O-fenantrolină	portocalie	535 nm
11	Fosforul	Briggs	Fosfomolibdat de amoniu	albastră	620 nm
12	Amilaza	Richterich	Iodul	albastră	620 nm

◆ în funcție de natura componentului de dozat, respectiv de culoarea soluției, se alege lungimea de undă (λ) adecvată care corespunde maximului de absorbție (extincția cea mai mare); în general, la fiecare metodă de dozare se indică lungimea de undă la care trebuie să se efectueze determinarea fotometrică;

◆ determinările se efectuează în prezența unei soluții martor conținută într-o cuvă cu aceeași grosime de strat ca cea în care se află proba de analizat;

◆ culoarea obținută trebuie să fie specifică pentru componentul care se dozează, deci să nu se producă interferențe cu alte substanțe;

◆ culoarea obținută trebuie să fie stabilă în intervalul de timp în care se fac determinările; la fiecare metodă de dozare se indică intervalul de timp în care culoarea este cea mai stabilă și cea mai intensă;

◆ intensitatea culorii trebuie să fie direct proporțională cu concentrația substanței de dozat, alegându-se în acest scop domeniul potrivit de concentrații.

III.2. CENTRIFUGAREA. ULTRACENTRIFUGAREA

III.2.1. GENERALITĂȚI

Dacă două obiecte diferite ca greutate și densitate sunt lăsate să cadă de la o anumită înălțime într-un mediu dens, viteza de cădere va fi diferită. În cazul în care obiectele sunt foarte ușoare, viteza lor de cădere va fi neglijabilă. Pentru a mări această viteză se folosește centrifugarea.

Centrifugarea este o metodă de separare a substanțelor dintr-un mediu heterogen, în funcție de greutatea moleculară, prin sedimentare forțată sub acțiunea forței centrifuge. Această operație se realizează într-un aparat special denumit centrifugă.

Centrifuga este alcătuită dintr-un motor ce permite rotirea rapidă, în jurul unui ax, a unor recipiente, tuburile de centrifugă, ce

conțin o soluție sau o suspensie pentru separare. Prin rotirea rapidă a rotorului particulele conținute vor fi supuse unei forțe centrifuge, G, mult mai ridicată decât cea datorată gravitației (g), astfel că ele vor atinge rapid o viteză limită relativ crescută.

Particulele de diferite dimensiuni din suspensie se vor depune în funcție de viteza cu care se rotește motorul și de timpul de centrifugare. La sfârșitul operației de centrifugare se obțin două fracțiuni: una **solidă**, la partea inferioară a tubului de centrifugă, denumită **sediment**, iar cealaltă **lichidă**, la suprafață, purtând numele de **supernatant**.

Centrifugele ce permit obținerea unor forțe cu valori mai mari de 100.000 g se numesc ultracentrifuge.

Pentru a evita supraîncălzirea rotorului acesta se învârtește într-o cameră vidată supusă unei răciri puternice.

Fracțiunile separate pot fi evidențiate după înregistrarea fotografică.

Introdusă în practica de laborator de către Svedberg încă din anul 1920, ultracentrifugarea și-a găsit aplicații importante, mai ales la separarea suspensiilor care conțin particule de dimensiuni foarte mici.

În prezent, centrifugarea și ultracentrifugarea sunt folosite curent în scopuri **preparative** și **analitice**.

Scopul preparativ al ultracentrifugării este acela de a fracționa **proteinele** și **lipoproteinele** din amestecuri, fiind una dintre metodele de determinare a masei moleculare a acestora.

Svedberg și colaboratorii săi au construit pentru prima dată o **ultracentrifugă** și au stabilit și teoria centrifugării ce va fi prezentată în cele ce urmează.

III.2.2. TEORIA CENTRIFUGĂRII

În figura III.3. sunt prezentați schematic parametrii ce descriu o particulă antrenată în procesul de centrifugare:

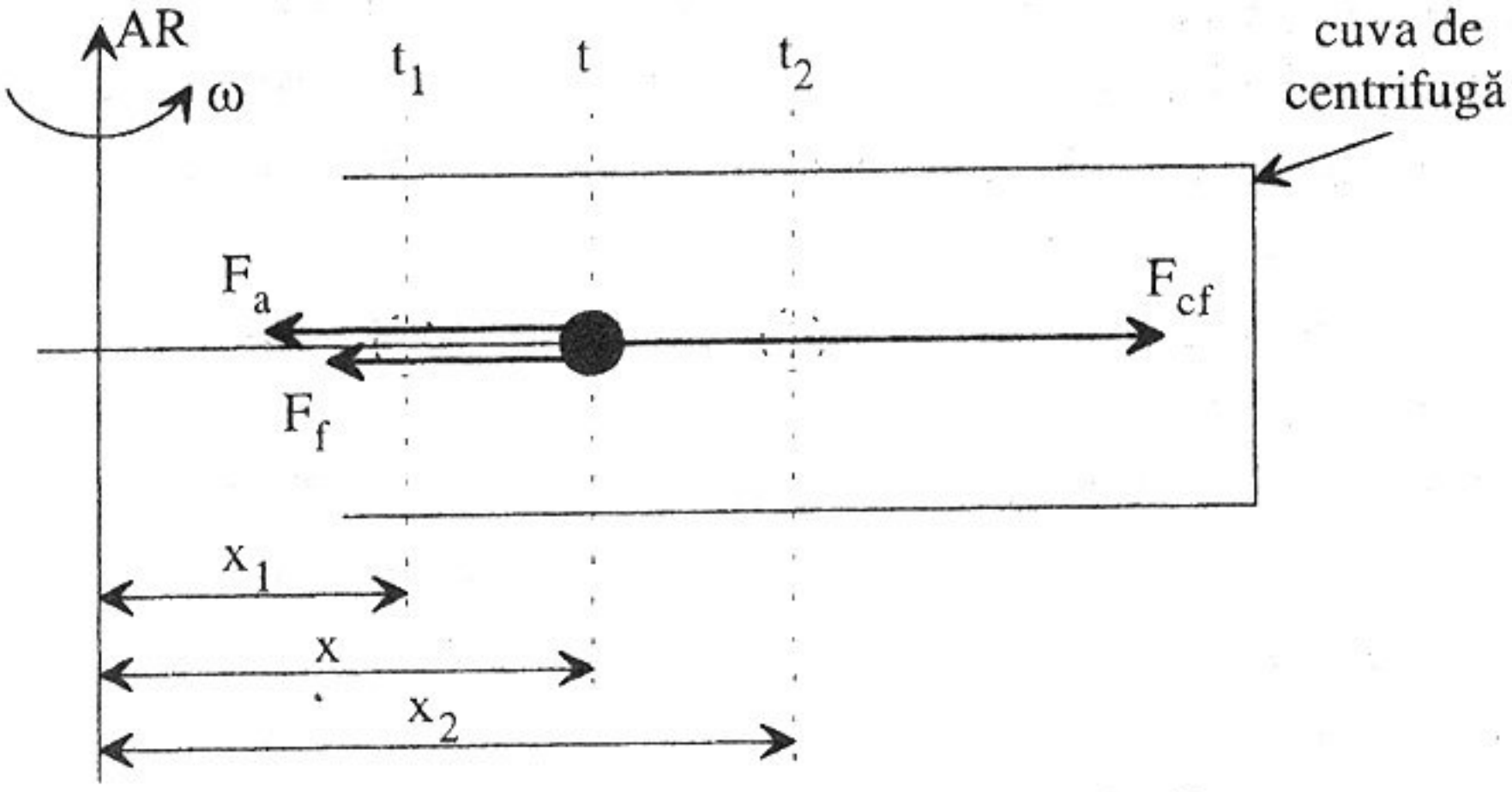


Fig.III.3. **Centrifugarea unei particule.**

AR = axul de rotație;

t_1, t_2 = momentele de timp la care particula se află în pozițiile 1 și 2 în cuva de centrifugă;

x, x_1, x_2 = distanțele de la particulă la axa AR;

F_a = forța arhimedică; F_f = forța de frecare;

F_{cf} = forța centrifugă; ω = viteza unghiulară;

Pentru că particulele aflate în procesul de sedimentare se deplasează într-un mediu cu frecare, ele vor atinge o anumită viteză de sedimentare, iar rezultanta forțelor ce acționează asupra particulelor va fi nulă:

$$- F_a - F_f + F_{cf} = 0 \qquad (1)$$

sau

$$F_{cf} - F_a = F_f \qquad (2)$$

Forța centrifugă joacă rol de „greutate”:

$$F_{cf} = m_0\omega^2 x = m_0 g \qquad (3)$$

m_0 = masa particulei

g = accelerația centripetă dată de relația:

$$g = \beta g_0 \qquad (4)$$

unde β = factorul de accelerație ce arată de câte ori forța centrifugă este mai mare decât accelerația gravitațională $g_0 = 9{,}8\ m/s^2$.

Forța arhimedică este dată de expresia:

$$F_a = \frac{m_0}{\rho_0} \cdot \rho \cdot g \qquad (5)$$

unde: ρ_0 = densitatea particulei;

ρ = densitatea lichidului de suspensie.

Pentru particule sferice, forța de frecare este dată de relația:

$$F_f = 6\pi\eta r_0 v_s \qquad (6)$$

unde: η = coeficientul de vâscozitate;

r_0 = raza particulei sferice;

v_s = viteza de sedimentare.

Corelând relațiile (2), (5) și (6) se obține:

$$m_0(1 - \frac{\rho}{\rho_0}) \cdot g = 6\pi r_0 \eta v_s \qquad (7)$$

Coeficientul de difuzie al unei particule sferice este dat de relația:

$$D' = \frac{kT}{6\pi r_0 \eta} = \frac{RT}{6\pi r_0 \eta N_A} \qquad (8)$$

unde: R = constanta universală a gazelor ($8{,}31 \cdot 10^3$);

T = temperatura absolută (în grade Kelvin);

N_A = numărul lui Avogadro.

Din relațiile (7) și (8) rezultă:

$$m_0(1 - \frac{\rho}{\rho_0}) \cdot g = \frac{RTv_s}{DN_A} \qquad (9)$$

Viteza de sedimentare este dată de relația:

$$v_s = \frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1} \qquad (10)$$

Ea depinde de viteza unghiulară (turația centrifugei).

De aceea, particulele se caracterizează prin constanta de sedimentare (s) ce se definește ca viteza de centrifugare într-un câmp centrifugal de o unitate ($g = 1\ m/s^2$).

$$s = \frac{v_s}{g} = \frac{\frac{dx}{dt}}{\omega^2 x} \Rightarrow v_s = s \cdot g \qquad (11)$$

Constanta de sedimentare este caracteristică fiecărei particule de un anumit tip și se exprimă în unități Svedberg ($1s = 10^{-13}$ sec).

Prin definiție volumul specific al unei particule este volumul unității de masă:

$$V_0 = \frac{1}{\rho_0} \qquad (12)$$

Corelând relațiile (9), (11) și (12) se obține:

$$m_0(1 - \rho V_0) = RT\frac{s}{DN_A} \qquad (13)$$

Masa molară este dată de relația:

$$\mu = m_0 N_A \qquad (14)$$

iar introducând relația (13) în (14) obținem expresia pentru determinarea masei molare a unei biomacromolecule:

$$\mu = \frac{RTs}{D(1-V_0\rho)} \qquad (15)$$

Pentru fiecare tip de particulă se determină experimental valorile lui D (m^2/s), V_0 (cm^3/g), s (în Svedbergi) și ρ (g/cm^3) la temperatura T = 293,15 K (20°C) și se calculează masa (kg/kmol = D) pe baza ecuației (15).

III.3.3. TIPURI DE CENTRIFUGARE. APLICAȚII

Numeroasele îmbunătățiri aduse tehnicii centrifugării (ultracentrifugării), datorate progreselor realizate în construirea aparatelor de centrifugare și utilizării unor medii stabilizatoare, au permis efectuarea unor separări diferențiate în funcție de tipul de metodă folosit.

◆ **Centrifugarea simplă**

Această metodă presupune centrifugarea la rece a suspensiei depuse într-un tub de centrifugă ce conține o soluție de zaharoză fiind utilizată pentru separarea omogenatelor tisulare.

După 10 minute de centrifugare la 700·g sedimentează debriurile celulare (membranele) și nucleii, constituienții celulari cei mai grei. Supernatantul acestei centrifugări este centrifugat 10 minute la 10.000·g. Se obține un sediment ce conține mitocondriile și lizozomii.

Supernatantul obținut după această centrifugare este supus unei forțe centrifuge la cel puțin 100.000·g, timp de 60 minute, sedimentând microzomii și ribozomii.

Supernatantul final conține citosolul, partea solubilă a celulei, care se dizolvă în soluție de zaharoză.

Particulele separate prin centrifugarea simplă nu sunt pure și de aceea, trebuie completată separarea printr-o centrifugare mai precisă de alt tip.

Centrifugarea simplă se folosește în laboratorul clinic și penru separarea plasmei de elementele figurate.

Sângele recoltat pe un anticoagulant este introdus în tubul de centrifugă și centrifugat la 3000 rot/min. Se va depune un sediment reprezentat de elementele figurate (leucocite, eritrocite și plachetele sanguine), iar supernatantul este plasma ce conține toate componentele sanguine dizolvate în apă.

◆ **Centrifugarea de zonă**

În tubul de centrifugă se introduce zaharoza astfel încât concentrația să varieze liniar între 20% la fundul tubului și 5% la suprafața sa. În tubul astfel pregătit se introduce omogenatul tisular sau suspensia într-un strat subțire la suprafața zaharozei.

În timpul centrifugării, particulele vor coborî mai încet sau mai repede în funcție de constanta lor de sedimentare, formând benzi separate.

Concentrația diferită a zaharozei în tub stabilizează benzile separate și limitează difuzia.

În cazul centrifugării simple se obțin de fiecare dată două fracțiuni: **sedimentul** și **supernatantul**.

În cazul centrifugării de zonă, particulele sunt repartizate de-a lungul întregului tub în funcție de coeficientul de sedimentare. Pentru a obține particulele se face un orificiu la partea inferioară a tubului și se recoltează lichidul în fracțiuni mici ce conțin diferitele particule separate.

Metoda centrifugării de zonă a fost folosită pentru fracționarea tipurilor de ARN.

- **Centrifugarea în gradient de densitate** (centrifugarea isopionică)

Metoda de centrifugare la echilibru în gradient de densitate, permite fracționarea particulelor în funcție de densitate și nu pe baza constantei de sedimentare.

Metoda se aseamănă centrifugării de zonă folosind tot un suport lichid în gradient de concentrație, dar în acest caz se folosesc lichide cu densitate foarte mare.

Substanța folosită pentru realizarea gradientului de densitate trebuie să îndeplinească anumite condiții:

- să aibă densitate mare, între anumite limite;
- să aibă activitate osmotică redusă;
- să fie ușor solubilă în apă;
- să nu modifice pH-ul sau tăria ionică;
- să nu aibă proprietăți denaturante sau să fie tensioactivă;
- să nu interfere cu activitatea biologică a produsului de analizat.

Aceste condiții nu sunt îndeplinite în totalitate de toate substanțele folosite pentru realizarea gradientului.

Pentru centrifugarea în gradient de densitate cele mai folosite substanțe sunt: soluție de zaharoză de concentrație foarte mare și soluție de clorură de cesiu ($CsCl_2$ 8 n) cu densitate foarte mare.

S-au mai folosit, în mai mică măsură, tartratul de potasiu, acetatul de potasiu, glicerol, polivinilpirolidona.

Particulele supuse ultracentrifugării în gradient de densitate se vor dispune sub formă de benzi în zona în care lichidul are densitate apropiată de densitatea proprie.

Acest tip de ultracentrifugare s-a folosit pentru separarea unor **particule subcelulare** (mitocondriile și lizozomii), pentru fracționarea și **caracterizarea ADN**, dar și pentru separarea unor componente proteice de importanță diagnostică, **lipoproteinele plasmatice**.

Separarea prin ultracentrifugare în gradient de densitate a lipoproteinelor plasmatice se bazează pe faptul că fracțiunile lipoproteice bogate în trigliceride și esteri de colesterol, dar mai sărace în proteine, având o densitate mai mică tind să floteze, adică să se ridice la suprafața eprubetei de centrifugă.

Realizând ultracentrifugarea lipoproteinelor plasmatice în mediu cu densitate diferită s-au separat patru fracțiuni lipoproteice:

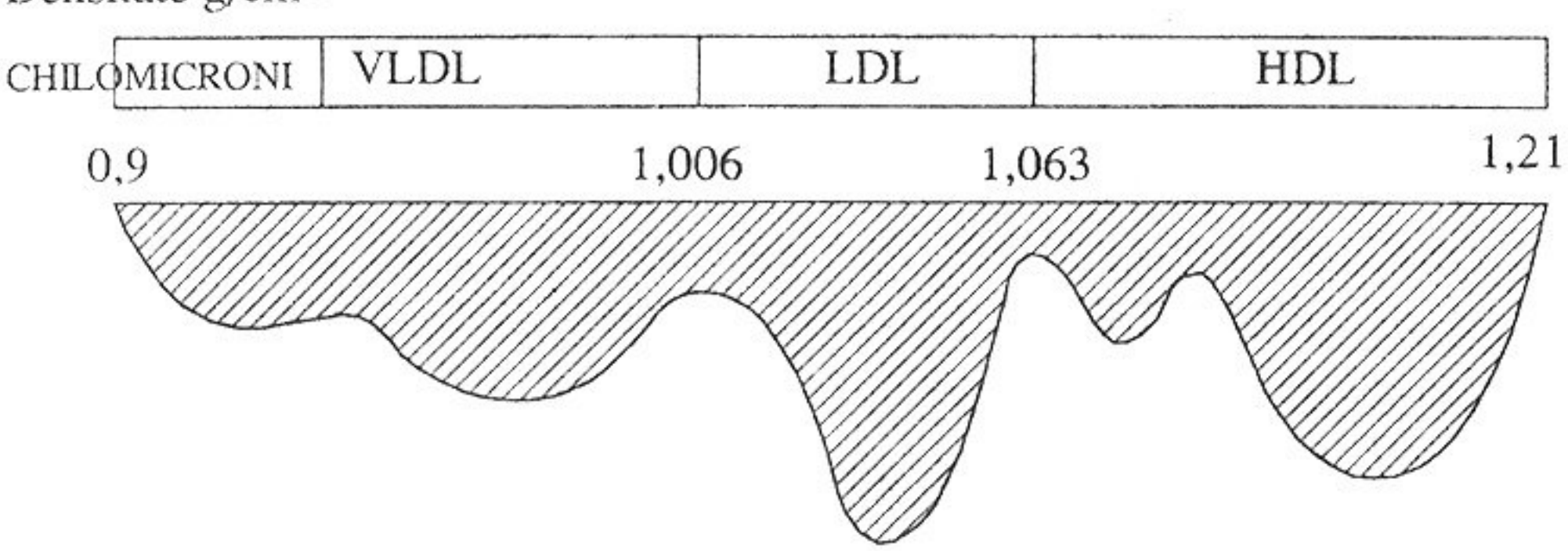


Fig.III.4. **Schema de separare a lipoproteinelor plasmatice prin ultracentrifugare.**

◆ chilomicronii care conțin aproximativ 99% lipide și au densitate foarte mică (0,96 g/cm^3) tinzând să floteze.

◆ lipoproteinele cu densitate foarte mică (VLDL = very low density lipoproteins) cu densitatea 1,006 g/cm^3.

◆ lipoproteinele cu densitate mică (LDL = low density lipoproteins) având o densitate relativă 1,063 g/cm^3.

◆ lipoproteinele cu densitate ridicată (HDL = high density lipoproteins) a căror densitate variază între 1,125 - 1,21 g/cm^3.

Metoda ultracentrifugării este, totuși, o metodă laborioasă și nu se recomandă a fi folosită la separarea lipoproteinelor plasmatice în laboratorul clinic pentru analizele de rutină. Se folosește mai ales în scopuri de cercetare pentru caracterizarea acestor componente plasmatice.

III.3. ELECTROFOREZA

O aplicație importantă a caracterului amfoter al aminoacizilor și proteinelor este tehnica de electroforeză.

Electroforeza reprezintă o metodă fizico - chimică analitică și preparativă care se bazează pe fenomenul migrării unor particule, sau unui ansamblu de particule încărcate electric într-un mediu lichid sau solid, sub acțiunea unui câmp electric extern.

Prin înaltele sale performanțe, electroforeza, în diferitele ei variante moderne, s-a impus ca una dintre cele mai eficace și accesibile metode în laboratorul clinic și cercetarea biochimică.

III.3.1. BAZELE TEORETICE ALE ELECTROFOREZEI

Noțiuni generale. Prin suspendarea unei particule coloidale, de exemplu a unei proteine, într-un mediu lichid, la interfața dintre cele două faze (lichid - particulă) apare un dublu strat electric; sarcinilor electrice de un anumit semn ale particulei le corespund sarcini electrice de semn contrar, datorită dipolilor apei care înconjoară particula (fig.III.5.).

Echilibrul astfel realizat poate fi anulat prin aplicarea unui câmp electric extern. În funcție de pH-ul mediului, câmpul electric

aplicat determină migrarea particulei încărcate electric spre unul din cei doi electrozi între care s-a realizat o diferență de potențial.

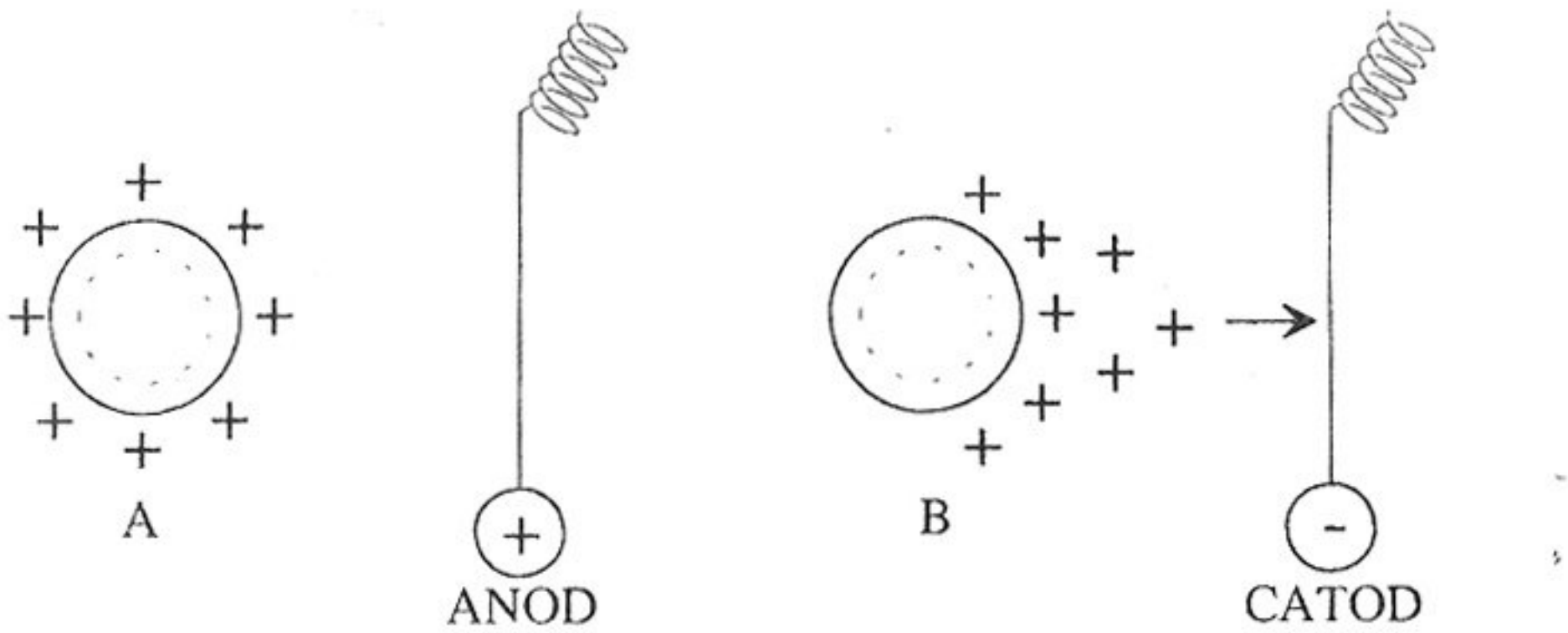


Fig.III.5. **Comportarea unei particule în soluție și într-un câmp electric.**

Dacă o particulă încărcată electric, suspendată într-un mediu lichid, este supusă acțiunii unui câmp electric extern, această particulă va poseda o energie potențială determinată de sarcina ei și de intensitatea câmpului electric aplicat. În câmpul electric creat, o astfel de particulă tinde să se deplaseze în sensul impus de natura sarcinii sale cu o forță F proporțională cu produsul dintre valoarea sarcinii electrice a particulei respective (e) și intensitatea câmpului electric aplicat (E):

$$F = e \cdot E \qquad (1)$$

Acestei deplasări i se opune însă frecarea internă datorită mediului, frecare care se face cu o forță (F') proporțională cu viteza particulei. Această forță, care este de sens invers și care are ca efect frânarea, respectiv întârzierea mișcării particulei, depinde de geometria acesteia și este dată de relația lui Stockes:

$$F' = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \qquad (2)$$

în care: η = vâscozitatea mediului; v = viteza particulei; r = raza particulei; $6 \cdot \pi \cdot r$ = factorul calculat pentru particulele de formă sferică.

În condiții de echilibru, cele două forțe F și F' sunt egale:

$$F = F' \qquad (3)$$

Deci:

$$e \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot \nu \qquad (4)$$

Așadar, viteza de migrare (ν) a particulei este dată de relația:

$$\nu = \frac{e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \qquad (5)$$

Mobilitatea electroforetică. În procesul de electroforeză intervine o mărime caracteristică și anume, mobilitatea electroforetică (u) care reprezintă viteza de deplasare a unei particule corespunzătoare unui câmp electric de un volt/cm. Mobilitatea electroforetică este direct proporțională cu viteza de migrare (ν) și invers proporțională cu intensitatea câmpului (E):

$$u = \frac{\nu}{E} \qquad (6)$$

Dacă vom nota în relația (5):

$$K = \frac{1}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \qquad (7)$$

rezultă relația:

$$\nu = K \cdot e \cdot E \qquad (8)$$

Introducând valoarea vitezei de migrare (ν) astfel exprimate în relația (6) obținem:

$$u = K \cdot e \qquad (9)$$

Ecuația reprezintă „expresia unui caz ideal", deoarece nu implică decât acțiunea celor doi factori principali - **câmpul electric** și **frecarea internă** - care determină sensul și ordinul de mărime al vitezei de migrare electroforetică. În practica electroforetică intervin și alți factori care guvernează migrarea particulelor, ca: pH-ul, concentrația electroliților, interacțiunea datorată încărcării ionilor, parametrii câmpului electric aplicat, temperatura, etc.

De exemplu, forța ($F = e \cdot E$) care se exercită asupra unei particule într-un câmp electric este influențată de către anumiți ioni din mediu; aceștia, posedând sarcini electrice de semn contrar particulei proteice, formează un „nor" - o pătură în jurul acestei particule care se deplasează în câmpul electric. Ca o consecință a acestui fenomen, ionii de sarcină contrară tind să antreneze particula în direcția opusă sensului ei de migrare, determinând astfel o micșorare a mobilității electroforetice. Potențialul de sarcină contrară care se creează în jurul particulei coloidale și care tinde să-i frâneze viteza de migrare este denumit potențial electrocinetic. De asemenea, unele medii utilizate ca suport de migrare în electroforeză (hârtie de filtru, agar, etc.) se încarcă negativ la pH-ul la care se efectuează electroforeza. Din această cauză, lichidul care îmbibă suportul de migrare se încarcă pozitiv, ceea ce determină migrarea acestuia spre polul negativ, atunci când se aplică un câmp electric. Acest fenomen de deplasare în sens contrar a lichidului este denumit electroendosmoză și tinde să micșoreze astfel mobilitatea electroforetică a particulelor, respectiv a proteinelor. De exemplu, într-o soluție tampon cu pH alcalin proteinele migrează spre anod, deplasarea lichidului efectuându-se în direcție contrară deplasării proteinelor. Datorită electroendosmozei, mobilitatea electroforetică a proteinelor este, deci, mai mică decât cea teoretică.

În consecință, luând în considerare efectul electroendosmozei, mobilitatea electroforetică a unei proteine este dată de relația:

$$u = \frac{d}{t \cdot E} \qquad (10),$$

în care: d = distanța (în cm) până la care ar trebui să migreze, teoretic, componentul respectiv în lipsa efectului de electroendosmoză;

t = durata analizei (în secunde);

E = câmpul electric aplicat (în V/cm).

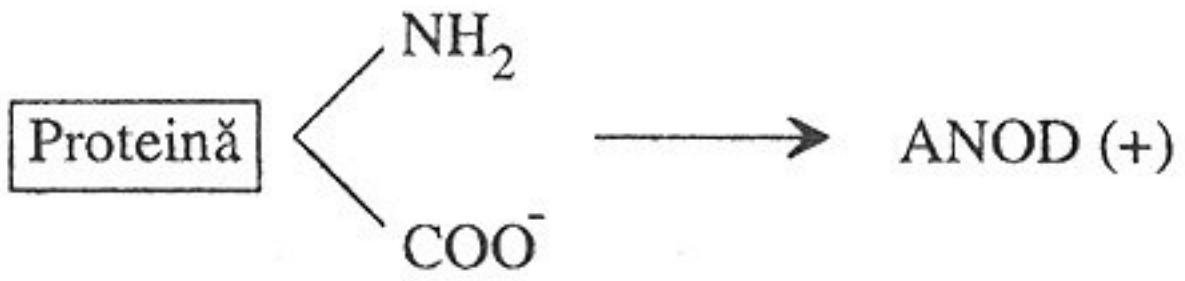
Rezultă, deci, că mobilitatea electroforetică se exprimă în $cm^2 \cdot s^{-1}V^{-1}$, deoarece:

$$u = \frac{d}{t \cdot E} = \frac{cm}{s \cdot \frac{V}{cm}} = cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1} \qquad (11)$$

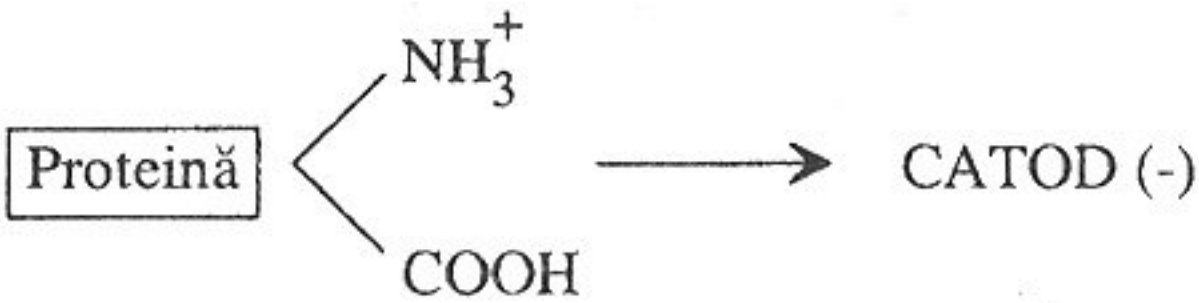
Din relația (9), ca și din relația (5) rezultă că mobilitatea electroforetică este proporțională cu sarcina electrică (e). În cazul proteinelor, care posedă mai multe grupări ionizabile, sarcina electrică variază între anumite limite, deoarece ea nu corespunde sarcinii unui electron ($4{,}80 \cdot 10^{-10}$ unități electrostatice) sau a unui multiplu al acestuia, așa cum este cazul cu sarcina electrică (e) a ionilor.

Variația sarcinii electrice a proteinelor este dependentă de pH-ul mediului în care se efectuează electroforeza. Astfel:

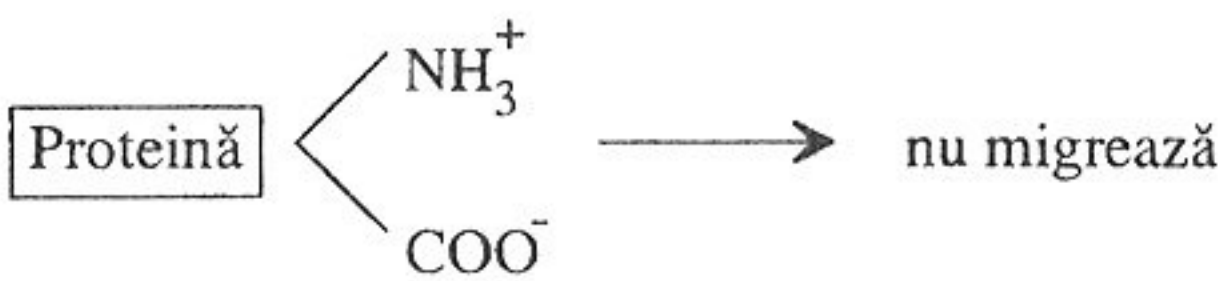
- în mediu alcalin (pH>7), proteinele se încarcă electronegativ datorită disocierii grupărilor **carboxil** ale acidului aspartic și glutamic (acide) și, în consecință, vor migra spre anod:



- în mediu acid (pH<7), proteinele se încarcă electropozitiv datorită disocierii grupărilor **amino, guanido** și **imidazol** (bazice) și vor migra, în consecință, spre catod:



Pentru fiecare proteină există o valoare de pH caracteristică, la care proporția sarcinilor electrice de semn contrar este, în general, egală, sarcinile compensându-se reciproc. La acest pH, denumit **pH izoelectric**, mobilitatea electroforetică devine nulă, iar proteina nu migrează într-un câmp electric:



În conformitate cu ecuațiile (5) și respectiv (9), rezultă că pe măsură ce pH-ul tamponului de electroforeză prezintă valori mai îndepărtate de pH-ul izoelectric, gradul de disociere al grupărilor ionizabile ale proteinelor va crește; în consecință, sarcina electrică (e) a acestora va deveni mai mare, ceea ce se repercutează asupra creșterii mobilității electroforetice.

Separarea electroforetică a diferitelor tipuri de proteine necesită realizarea unor condiții experimentale riguroase de pH și tărie ionică (μ).

*

* *

După natura suportului (mediului) utilizat pentru fracționarea proteinelor, electroforeza poate fi: în coloană de lichid (mediu omogen) și de zonă (zonală), care se efectuează pe suporturi solide de migrare (mediu eterogen).

Electroforeza de zonă se poate realiza în variante diferite, în funcție de natura suportului de migrare și anume: electroforeză pe hârtie de filtru și electroforeză în geluri (agar, amidon, poliacrilamidă, mixte).

III.3.3. ELECTROFOREZA ÎN GELURI A PROTEINELOR

Ca suport de electroforeză zonală, **gelurile** prezintă o serie de avantaje în comparație cu hârtia de filtru:

- capacitate de rezoluție (separare) superioară (în special, gelurile de poliacrilamidă și amidon);
- unele geluri îmbină proprietatea de separare pe baza sarcinilor electrice ale moleculelor cu proprietatea de „**cernere**" sau „**filtrare moleculară**" (în funcție de masa moleculară), ceea ce le conferă capacitatea unei înalte rezoluții (25 - 30 fracțiuni proteice);
- separarea mai netă a fracțiunilor, datorită micșorării difuziei libere a moleculelor în cursul migrării;
- absorbția mai mică a moleculelor care migrează în câmpul electric;

• migrarea mai rapidă și de calitate superioară cu micșorarea efectului de electroendosmoză;

• posibilitatea obținerii de geluri cu pori de diferite dimensiuni.

Prin performanțele lor analitice, gelurile care prezintă cea mai înaltă aplicabilitate în laboratorul clinic sunt cele de amidon, poliacrilamidă și mixte (poliacrilamidă și agaroză).

III.3.3.1. ELECTROFOREZA ÎN GEL DE AMIDON

Utilizarea gelului de amidon în separarea proteinelor se bazează pe cumularea efectului datorat sarcinilor electrice ale proteinelor cu cel de sită moleculară (filtrare moleculară) al gelului de amidon.

Se utilizează amidonul parțial hidrolizat în anumite condiții: prin încălzirea la 62°C și răcire, acesta se gelifică. Electroforeza în gel de amidon se efectuează cu predilecție în varianta cu **discontinuitate de pH**:

- gelul se obține în soluția tampon de un anumit pH (7,6);
- soluția tampon pentru electroforeză existentă în compartimentele electrozilor are un pH diferit (8,4).

Gelificarea amidonului se realizează într-o casetă de material plastic prevăzută cu o ramă detașabilă care permite, după efectuarea migrării, secționarea gelului și revelarea în interiorul acestuia a fracțiunilor proteice separate.

III.3.3.2. ELECTROFOREZA ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ

Gelul de poliacrilamidă (PAA) este un gel cu remarcabile proprietăți mecanice și de separare electroforetică și în același timp un gel stabil, transparent și „flexibil". Gelul rezultă prin polimerizarea acrilamidei ($CH_2 = CH - CONH_2$) în prezența N, N'- metilen bisacrilamidei (BIS), a N, N - N', N' tetrametil - etilendiaminei (TEMED) și a persulfatului de amoniu drept catalizator.

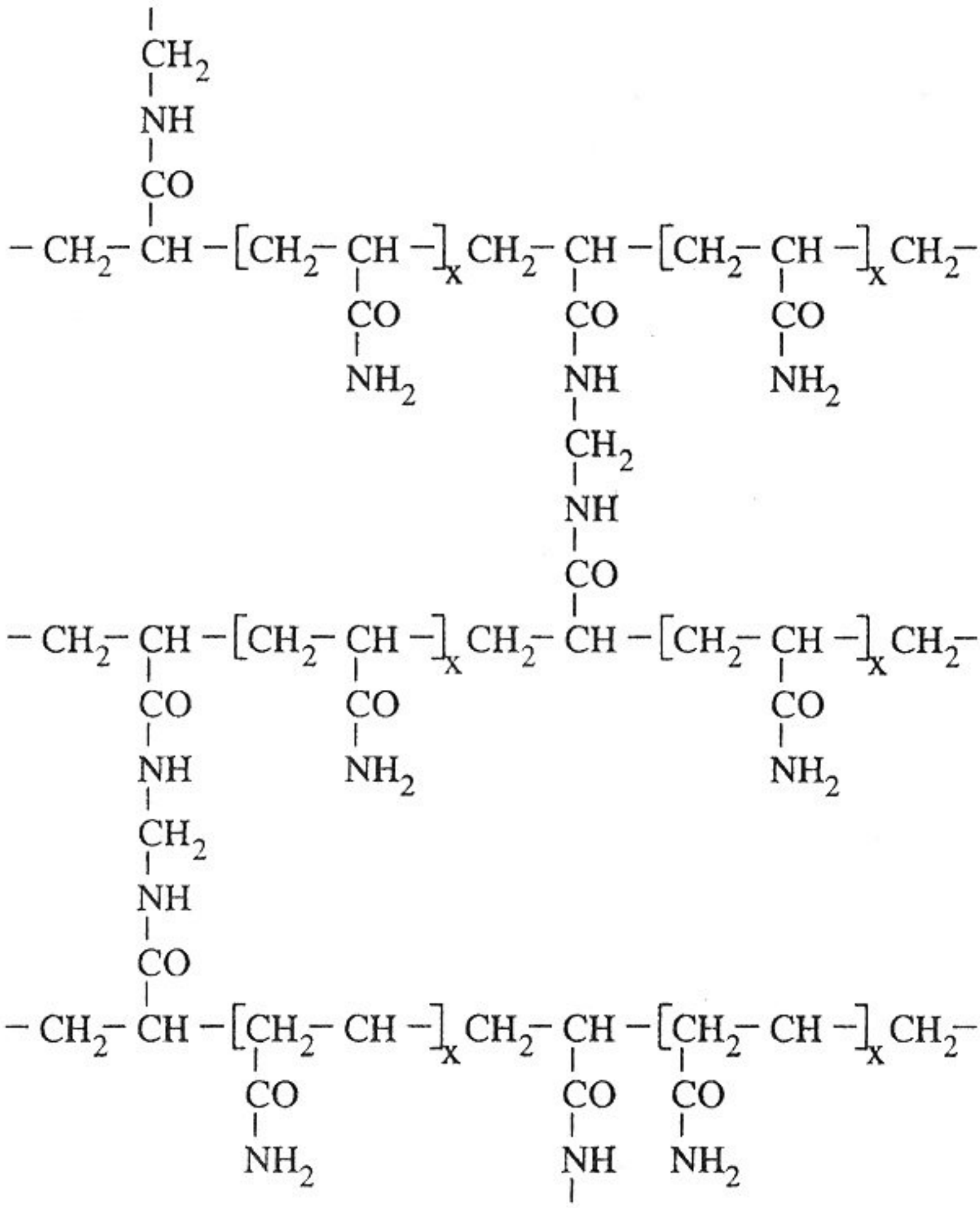


Fig.III.6. **Rețea tridimensională de acrilamidă - bisacrilamidă.**

Structural gelul se prezintă ca o rețea tridimensională formată din catene liniare lungi de monomeri de acrilamidă legate încrucișat prin punți metilenice (fig.III.6.).

III.4. ANALIZA CROMATOGRAFICĂ

III.4.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Cromatografia reprezintă o metodă analitică - cantitativă și calitativă - care permite separarea (fracționarea) unor componente (bio)chimice din amestecuri complexe, utilizând ca suport de fracționare medii ce prezintă anumite proprietăți caracteristice.

În principiu, analiza cromatografică se bazează pe diferența de adsorbție, în raport cu anumiți adsorbanți, a componentelor separabile, pe coeficientul de repartiție al acestor componente între două faze nemiscibile sau parțial miscibile, pe capacitatea de schimb ionic dintre anumite componente și suportul de fracționare.

În funcție de mecanismul procesului de separare și, respectiv de natura suportului pe care se efectuează analiza, cromatografia este de mai multe tipuri și anume:

► cromatografia de **adsorbție**: separarea pe baza capacității diferite de adsorbție a unor substanțe dintr-un amestec, în raport cu un mediu (suport) poros care adsoarbe selectiv;

► cromatografia de **partiție**: separarea pe hârtie de filtru sau coloană a diferitelor substanțe dintr-un amestec pe baza coeficientului de repartiție diferit între două lichide parțial miscibile sau nemiscibile;

► cromatografia de **afinitate**: separarea unui component dintr-un amestec, component ce este reținut selectiv pe un suport insolubil pentru care manifestă un anumit grad de afinitate;

► cromatografia de **schimb ionic**: separarea substanțelor polare datorită grupărilor ionizabile - acide sau bazice - grefate pe un suport denumit schimbător de ioni dotat cu proprietatea de a reține și a elibera ulterior aceste substanțe;

► cromatografia de **excludere moleculară**: separarea componentelor dintr-un amestec cuprinzând mai multe specii moleculare pe baza mărimii, respectiv a „taliei lor moleculare";

► cromatografia în **strat subțire**: separarea unor componente pe un suport de material adsorbant dispus într-un strat subțire (celuloză, silicagel, etc.) pe baza proceselor de adsorbție și repartiție diferite;

► cromatografia în **fază gazoasă**: separarea bazată pe distribuția componentelor dintr-un amestec între o fază lichidă menținută staționară pe o coloană dintr-un suport solid și o fază gazoasă care se deplasează de-a lungul fazei staționare.

✗ III.4.2. CROMATOGRAFIA AMINOACIZILOR PE HÂRTIE

III.4.2.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Cromatografia pe hârtie utilizează ca suport pentru separarea diferitelor substanțe dintr-un amestec hârtia de filtru; această hârtie posedă anumite caracteristici, fiind destinată special pentru analiza cromatografică.

Mecanismul separării anumitor componente, respectiv a aminoacizilor dintr-un amestec, prin cromatografie pe hârtie se bazează pe procesul de repartiție diferită a acestora între două faze lichide parțial miscibile: o fază apoasă fixă, care este menținută staționară de către suport (hârtia de filtru) și o fază neapoasă (solvent organic) mobilă, care se deplasează de-a lungul porilor hârtiei de filtru.

Între aceste două faze, pe măsura deplasării solventului de-a lungul hârtiei, se petrece o redistribuire continuă a componentelor din amestec ce urmează a fi separate. Viteza de deplasare a acestor componente pe suportul de hârtie este însă diferită, datorită faptului că fiecare component prezintă un coeficient de repartiție diferit între cele două lichide parțial miscibile.

Noțiunea de R_f. Ca o reflectare a repartiției diferite a componentelor între cele două faze lichide (fază fixă și fază mobilă) și ca o modalitate de apreciere a poziției deplasării („migrării") pe hârtie a fiecărui component separat, s-a introdus noțiunea de R_f sau coeficientul R_f (factorul de retenție) care reprezintă raportul dintre distanța (d)

parcursă de către fiecare component separat dintr-un amestec și distanța (D) parcursă de solvent. Deci:

$$R_f = \frac{d}{D}$$

Valoarea R_f se exprimă în cm și definește pe cromatogramă („**documentul**" obținut după separarea și revelarea prin colorare a substanțelor separate) poziția fiecărui component separat din amestecul supus analizei.

Factorul de retenție are o valoare subunitară, caracteristică pentru un anumit component în condiții identice de efectuare a cromatografiei. Cu cât un component are o valoare R_f mai mare, cu atât el va migra mai rapid pe hârtia cromatografică; în consecință, componentul cu o valoare mare a R_f va avea o poziție mai îndepărtată de punctul de aplicare a probei pe cromatogramă (start) și, respectiv mai apropiată de frontul solventului.

III.4.2.2. PRINCIPIUL METODEI

Aminoacizii liberi sau proveniți din hidroliza proteinelor izolate dintr-un material biologic se separă pe hârtie de filtru specială sub formă de „spoturi" (pete) individualizate care apar colorate după pulverizarea hârtiei cu o soluție de ninhidrină (revelator). Procesul de separare se bazează pe repartiția diferită a aminoacizilor între două faze lichide - una staționară și alta mobilă - parțial miscibile.

Hârtia de filtru care constituie suportul de separare cromatografică se imersează la o extremitate a sa într-un amestec lichid convenabil (solvent organic + apă), denumit „lichid de irigare". Solventul migrează prin capilaritate de-a lungul hârtiei de filtru, iar amestecul de aminoacizi care este supus analizei - și depus prin pipetare ca un spot mic spre extremitatea hârtiei imersată în lichidul de irigare - este antrenat și se fracționează în direcția de migrare a frontului de lichid care irigă hârtia de filtru. După irigare, hârtia de filtru se usucă și se pulverizează cu o soluție de ninhidrină (sau cu soluții de reactivi

specifici pentru diferiți aminoacizi). Aminoacizii separați reacționează cu ninhidrina și se etalează în funcție de valoarea R_f-ului lor sub formă de spoturi colorate.

Aminoacizii se diferențiază și, respectiv se identifică, pe baza R_f-ului caracteristic fiecăruia; în raport cu frontul lichidului de irigare ($R_f = 1$), aminoacizii ocupă pe hârtie poziții diferite, caracterizate printr-o anumită valoare subunitară a R_f-ului.

„Documentul" analitic obținut după separarea, colorarea și identificarea aminoacizilor poartă denumirea de cromatogramă.

⋌ III.4.2.3. TIPURI DE CROMATOGRAFIE PE HÂRTIE

În funcție de direcția de migrare a solventului și, respectiv de separare a aminoacizilor, cromatografia pe hârtie se poate efectua în diferite variante:

Cromatografia descendentă. Hârtia cromatografică cu capătul pe care se depun probele de analizat se imersează într-o cuvă („jgheab") care conține lichidul de irigare și care se află amplasată în partea superioară a vasului de cromatografie; celălalt capăt al hârtiei rămâne liber. Hârtia cromatografică se află astfel suspendată în poziție verticală, iar direcția de migrare va fi de sus în jos -descendent- (fig.III.7.A).

Cromatografia ascendentă. Hârtia cromatografică se imersează cu capătul pe care se depun probele de analizat în lichidul de irigare care se află în partea inferioară a vasului de cromatografie, prin fixarea pe o baghetă de sticlă a capătului superior al hârtiei cromatografice, aceasta se suspendă într-o poziție verticală, iar direcția de migrare a lichidului de irigare va fi de jos în sus -ascendent- (fig.III.7.B).

Cromatografia bidimensională. Migrarea se efectuează în două etape; în prima, migrarea se realizează monodimensional ascendent (sau descendent), folosind un lichid de irigare de o anumită compoziție; în a doua etapă, migrarea se efectuează perpendicular pe

prima direcție de migrare, utilizând un lichid de irigare diferit de cel folosit în prima etapă (fig.III.7.C).

Cromatografia circulară. Migrarea se realizează pe o hârtie de filtru de formă circulară dispusă orizontal; proba conținând amestecul de aminociazi se depune în mijlocul hârtiei, iar lichidul de irigare (care pătrunde ascendent în centrul hârtiei) migrează radial, în toate direcțiile (fig.III.7.D).

În figura III.7. sunt prezentate diferite variante de cromatografie pe hârtie.

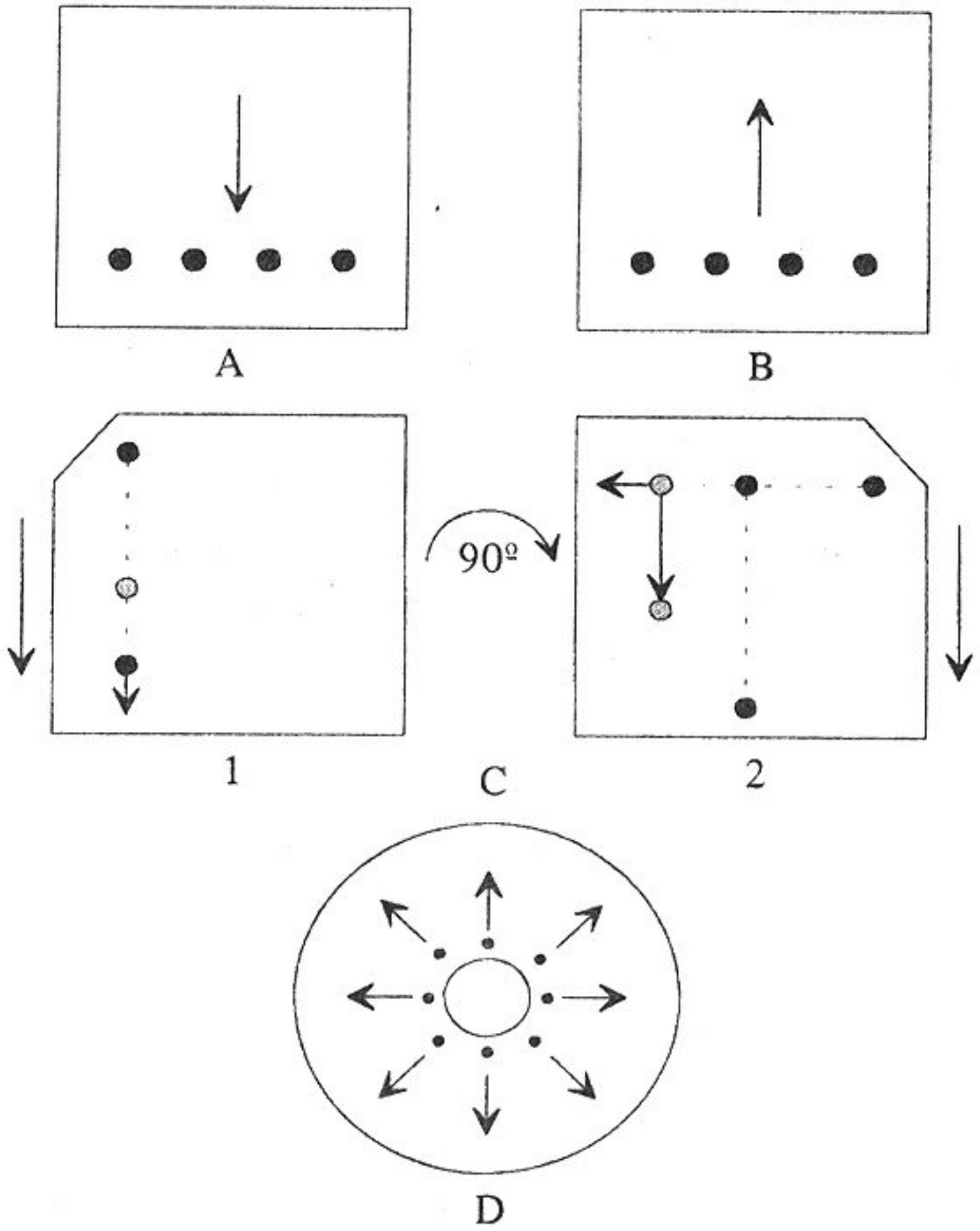


Fig. III.7. **Schema diferitelor variante de cromatografie pe hârtie.**

A - cromatografie monodimensională descendentă, B - cromatografie monodimensională ascendentă, C - cromatografie bidimensională: 1 - prima direcție de migrare; 2 - a doua direcție de migrare, D - cromatografie circulară.

Reactivi:

1. **Lichidul de irigare** este constituit din:

◆ butanol (solvent) 110 cm^3; ◆ acid acetic glacial 110 cm^3;

◆ apă distilată 30 cm^3.

Amestecul se agită într-o pâlnie de separare, operație prin care solventul organic se saturează cu apă. După un interval de câteva ore, amestecul se separă în două faze: faza conținând solventul saturat cu apă și care constituie lichidul de irigare și faza apoasă care se îndepărtează, fiind utilizată pentru saturarea cu vapori a spațiului din vasul în care se efectuează cromatografia.

2. Soluții **etalon** (martor) de aminoacizi. Se prepară următoarele seturi de soluții (amestecuri) conținând aminoacizi de concentrație $1 \cdot 10^{-2}$ m în alcool izopropilic 10% acidulat cu HCl.

M_1 = cistină, arginină, acid aspartic, alanină, valină, leucină;

M_2 = lizină, glicocol, acid glutamic, prolină, metionină;

M_3 = histidină, serină, treonină, hidroxiprolină, tirozină, fenilalanină;

M_4 = glutamină, acid γ-aminobutiric (sau numai triptofan).

3. Soluție **revelator** (pentru evidențierea tuturor aminoacizilor): ninhidrină 0,2% în alcool etilic 96º.

Pentru mărirea stabilității culorii spoturilor de aminoacizi pe cromatogramă, se utilizează reactivul ninhidrină - $CdCl_2$: 50 mg $CdCl_2$ se dizolvă în 4 cm^3 H_2O; se adaugă 0,2 cm^3 acid acetic, 1 g ninhidrină și se completează la 100 cm^3 cu alcool etilic 96º.

4. Soluție de 8-hidroxichinolină (pentru identificarea argininei): 8-hidroxichinolină 0,1% în soluție de hipobromit de sodiu (0,5 cm^3 brom în 250 cm^3 NaOH 0,5 n).

5. Soluție de acid sulfanilic diazotat (pentru identificarea histidinei): 25 cm^3 soluție de acid sulfanilic 0,3% în HCl 8%, 1,5 cm^3 soluție de $NaNO_2$ 5% (soluțiile se prepară extemporaneu) și soluție de Na_2CO_3 10%.

6. Soluție de α-nitroso-β-naftol (pentru identificarea tirozinei): α-nitroso-β-naftol 0,01% în alcool etilic, HNO_3 10%.

7. Soluție de isatină (pentru identificarea prolinei și hidroxiprolinei): isatină 0,4% în alcool n-butilic, conținând acid acetic 0,4%.

8. Soluție de iodoplatinat (pentru identificarea aminoacizilor cu sulf): 4 cm^3 soluție de $[PtCl_4]^{2-}$ $2 \cdot 10^{-3}$ m, 0,25 cm^3 soluție de KI 1 n, 0,4 cm^3 HCl 2 n și 76 cm^3 acetonă.

9. Soluție de reactiv Nessler - acid periodic (pentru identificarea serinei și treoninei): reactivul Nessler se adaugă peste acidul periodic până la dizolvarea precipitatului.

10. Alcool izopropilic 10%. 11. Cloroform.

Tehnica. Analiza aminoacizilor prin cromatografie pe hârtie implică următoarele operații:

Pregătirea probei de analizat. În funcție de scopul urmărit, analiza cromatografică se poate efectua asupra aminoacizilor liberi sau a celor proveniți din hidrolizate proteice, utilizând ca sursă diferite țesuturi (muscular, hepatic, cerebral etc.) sau lichide biologice (ser, plasmă, urină, lapte etc.).

În cazul analizei cromatografice a aminoacizilor liberi din serul sanguin se procedează astfel:

- 1 cm^3 ser se diluează cu 1 cm^3 apă distilată;
- proteinele se precipită, sub agitare, prin adăugare de 18 cm^3 alcool etilic 96%;
- precipitatul format se separă prin centrifugare (sau filtrare);
- la supernatantul obținut se adaugă 5 cm^3 apă distilată și 25 cm^3 cloroform;
- se agită puternic și se lasă în repaus;
- se formează două faze lichide, una cloroformică și alta apoasă;
- se separă faza cloroformică la care se adaugă 5 cm^3 apă distilată;
- amestecul se agită și se lasă în repaus;
- după îndepărtarea fazei cloroformice, cele două faze apoase se reunesc;
- faza apoasă obținută se trece într-o capsulă de sticlă și se evaporă lent, la sec, pe baia de apă;

◆ reziduul se reia în 0,1 cm^3 alcool izopropilic 10% acidulat cu HCl; aceasta constituie proba de aminoacizi ce urmează a fi analizată cromatografic.

Pentru acuratețea rezultatelor, supernatantul provenit din prelucrarea probelor și care conține aminoacizii ce urmează a fi separați cromatografic se purifică, în prealabil, prin trecerea sa printr-o coloană de schimbători de ioni. Prin acest procedeu se îndepărtează anumiți compuși a căror prezență scade calitatea separării cromatografice.

În acest scop, se utilizează o coloană (15 - 20 cm) de schimbător de ioni „Zerolit-225" (50 - 100 mesh) în formă H^+.

Procedeul utilizat cuprinde următoarele etape:

► aducerea coloanei în formă H^+ prin trecerea a 50 cm^3 acid clorhidric 1 n;

► spălarea coloanei cu apă bidistilată până la reacția neutră;

► introducerea în coloană a unui volum mic din supernatantul obținut după deproteinizare și reținere de către coloană a aminoacizilor prezenți în supernatant;

► spălarea ulterioară a coloanei cu apă bidistilată pentru îndepărtarea cationilor anorganici sau a altor componente nereținute de schimbătorul de ioni;

► eluția cu 25 cm^3 amoniac 10% a aminoacizilor reținuți pe coloană.

Lichidul amoniacal obținut prin eluție de pe rășina schimbătoare de ioni și care conține aminoacizii liberi este supus unei evaporări lente. Reziduul obținut este reluat cantitativ în alcool izopropilic 10% acidulat cu HCl. Aceasta reprezintă proba destinată pentru analiza cromatografică.

Pregătirea camerei cromatografice pentru developare. Camera de developare reprezintă un vas de sticlă de dimensiuni convenabile cu posibilitate de închidere etanșă (de exemplu, sistem Kropa).

Pentru efectuarea cromatografiei în sistem monodimensional descendent, partea superioară a vasului de cromatografie este prevăzută cu o cuvă de sticlă în care se introduce lichidul (solventul saturat cu apă) care va iriga hârtia de cromatografie. În partea inferioară a vasului se

pune o cutie Pétri deschisă (cu diametru mare) în care se află faza apoasă rezultată de la prepararea lichidului de irigare și care asigură menținerea unei atmosfere saturate cu vapori. Înainte de introducerea hârtiei de filtru pe care se află depuse probele de analizat, vasul de cromatografie trebuie să aibă deja o atmosferă saturată cu vapori.

În figura III.8. se prezintă schema unui asemenea vas de cromatografie în care se află introdusă hârtia de filtru.

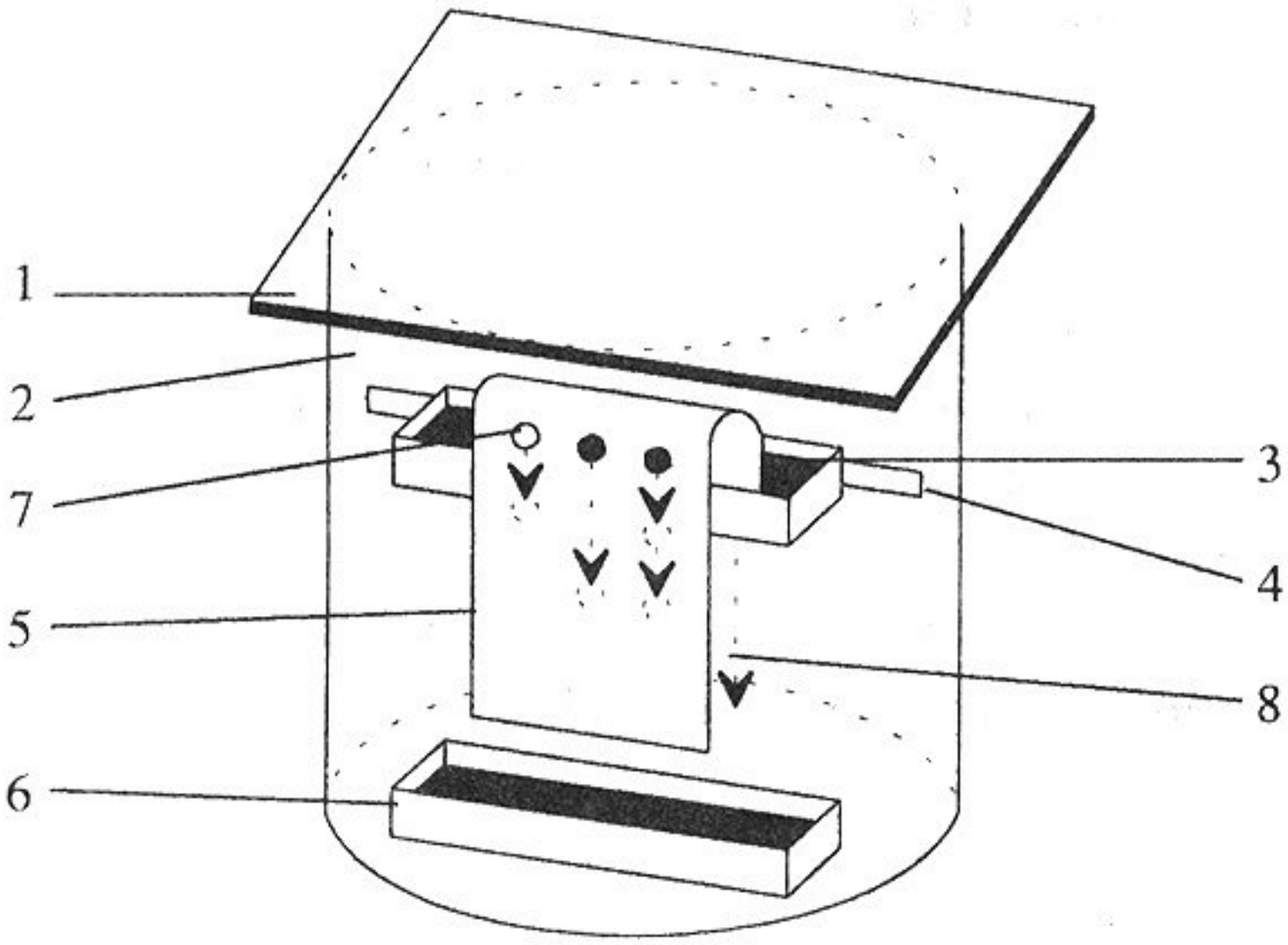


Fig.III.8. **Schema unui vas de cromatografie.**

1-capac care închide vasul de cromatografie; 2-vasul de cromatografie; 3-cuvă care conține lichidul de irigare; 4-suport pentru cuvă; 5-hârtie de filtru pe care sunt depuse probele (sistem monodimensional descendent); 6-cuvă care conține faza apoasă pentru saturarea atmosferei din vas; 7-punctul de aplicare a probei în care se depune amestecul de aminoacizi; 8-direcția de migrare a solventului (descendentă).

Depunerea probelor pe hârtia de filtru. Hârtia de filtru utilizată pentru cromatografie este de tip special, posedând anumite

caracteristici (omogenitate, densitate, grosime, puritate etc.). Se execută următoarele operații:

- pe o coală de hârtie de filtru Whatman-1 orientată cu direcția fibrelor în sensul de migrare a solventului, se trasează cu un creion linia de start la o distanță de 8 cm de la capătul colii;
- pe linia trasată se marchează la distanțe de 2,5 cm punctele care desemnează pozițiile de aplicare a probelor de analizat, iar la marginile laterale ale colii se lasă, de o parte și de alta, o distanță de 3,5 cm;
- în punctele marcate pe linia de start se depun cu o micropipetă câte 10 µl din soluțiile etalon (martor) de aminoacizi (M_1, M_2, M_3, M_4), precum și din proba conținând aminoacizii liberi din ser (reziduul reluat în 0,1 cm^3 alcool izopropilic);
- probele se aplică sub forma unor spoturi (pete) liniare sau circulare cu diametrul cât mai mic (< 0,5 cm); aplicarea se face în etape, respectiv în porțiuni mici, după uscarea fiecărui spot aplicat.

Developarea. După depunerea probelor ce conțin aminoacizi și uscarea spoturilor, coala de hârtie de filtru se introduce cu precauție în vasul de cromatografie. În prealabil, coala de hârtie se rulează ușor spre extremitatea la care s-au depus probele („**linia de start**"). Această extremitate a colii se introduce, cu porțiunea rulată, în cuva care conține lichidul de irigare. Porțiunea de hârtie imersată în lichidul din cuvă se fixează cu o baghetă de sticlă. Vasul de cromatografie se închide apoi etanș. Partea inferioară a colii de hârtie rămâne liberă (suspendată), coala respectivă având în vasul de cromatografie o poziție verticală. Frontul solventului parcurge prin capilaritate întreaga suprafață a hârtiei de filtru în sens descendent.

Developarea, respectiv separarea aminoacizilor prin parcurgerea de către solvent (lichidul de irigare) a hârtiei de filtru până la extremitatea liberă, se realizează la temperatură constantă (20 - 22°C), pe o durată de 16 - 18 ore și, de preferință, la întuneric.

Prin migrarea solventului, amestecul de aminoacizi (depus sub formă de spoturi pe linia de start) este fracționat, aminoacizii antrenați de solvent ocupând, conform principiului enunțat, poziții diferite pe hârtia de filtru în funcție de R_f-ul lor. Când frontul solventului a ajuns la

extremitatea liberă a hârtiei de filtru, aceasta se scoate din vasul de cromatografie și se usucă. După uscare coala de hârtie se introduce din nou în vasul de cromatografie, efectuându-se în aceleași condiții o nouă irigare. Irigarea repetată determină o separare, respectiv o individualizare mai bună a aminoacizilor.

Revelarea. După ultima irigare hârtia de filtru se scoate din vasul de cromatografie și se usucă la întuneric. Hârtia de filtru perfect uscată se pulverizează uniform, cu o soluție de ninhidrină. Ninhidrina reacționează cu aminoacizii separați și are astfel rolul de a revela (evidenția) spoturile corespunzătoare fiecărui aminoacid separat.

Hârtia de filtru pulverizată cu revelator se introduce în etuvă la 105 - 110°C; aminoacizii separați și care au reacționat cu ninhidrină, apar sub formă de spoturi colorate în violet - albastru pe fondul alb al hârtiei de filtru. Excepție de la această culoare fac următorii aminoacizi:

- prolina și hidroxiprolina, care se colorează în galben;
- cisteina și cistina, care se colorează în brun - deschis;
- fenilalanina și tirozina, care se colorează în albastru;
- histidina și triptofanul, care se colorează în violet - brun.

Documentul analitic astfel obținut poartă numele de cromatogramă („**hartă cromatografică**").

Revelarea prin reacții specifice. Pe o serie de alte coli de hârtie de filtru „irigate" în aceleași condiții se efectuează reacții de identificare specifice pentru unii aminoacizi (mai ales pentru cei cu R_f-uri apropiate). Prin asemenea reacții se obțin culori caracteristice, care sunt diferite de culoarea dată de aminoacizii respectivi cu ninhidrina.

Reacția pentru **arginină**: prin pulverizare cu soluție de 8-hidroxichinolină, uscare și ulterior pulverizare cu soluție de hipobromit de sodiu apare spotul colorat în portocaliu, specific argininei.

Reacția pentru **histidină**: prin pulverizare cu soluție de acid sulfanilic și apoi cu soluție de Na_2CO_3, histidina apare sub forma unui spot de culoare roșie.

Reacția pentru **tirozină**: prin pulverizare cu soluție de α-nitroso-β-naftol și încălzire la 90ºC, se identifică tirozina sub forma unui spot colorat în roz.

Reacția pentru **prolină** și **hidroxiprolină**: prin pulverizare cu soluție de isatină și încălzire la 100ºC, prolina apare colorată în albastru - intens, iar hidroxiprolina în verde.

Reacția pentru **aminoacizi cu sulf**: prin pulverizare cu soluție de iodoplatinat, aminoacizii cu sulf ca cisteina și cistina apar sub formă de spoturi colorate în brun.

Reacția pentru **serină** și **treonină**: prin pulverizare cu reactiv Nessler - acid periodic, serina și treonina se evidențiază sub formă de două spoturi colorate în portocaliu intens.

Evaluarea calitativă a aminoacizilor. Pentru interpretarea cromatogramei, se folosesc următoarele procedee:

- identificarea aminoacizilor din proba de analizat prin comparare cu poziția pe cromatogramă a aminoacizilor din amestecurile etalon (M_1 - M_4);
- identificarea aminoacizilor din proba de analizat pe baza unor reacții specifice;
- identificarea aminoacizilor din proba de analizat prin măsurarea R_f-urilor aminoacizilor etalon.

Prin ultimul procedeu se măsoară cu rigla distanța de la punctul de aplicare a probei de analizat (start) până la mijlocul fiecărui spot de aminoacid de pe cromatogramă (d); se face raportul dintre această distanță și distanța de la punctul de aplicare a probei până la frontul solventului, respectiv distanța parcursă de solvent (D).

Se obține, astfel, R_f-ul fiecărui aminoacid, conform relației:

$$R_f = \frac{d\ (cm)}{D\ (cm)}$$

Se stabilesc pentru fiecare aminoacid de pe cromatogramă valorile R_f și se compară cu valorile prezentate în tabel. În sistemul de irigare butanol -acid acetic -apă, valorile R_f (cm), în ordine crescătoare, ale diferiților aminoacizi sunt următoarele:

TABELUL III.3. VALORILE R_f ALE UNOR AMINOACIZI ÎN SISTEMUL BUTANOL - ACID ACETIC - APĂ.

Aminoacidul	R_f	Aminoacidul	R_f	Aminoacidul	R_f
cisteină	0,07	glicocol	0,26	tirozină	0,45
cistină	0,08	serină	0,27	triptofan	0,50
lizină	0,14	acid glutamic	0,30	metionină	0,55
ornitină	0,15	hidroxiprolină	0,31	valină	0,60
arginină	0,20	alanină	0,35	fenilalanină	0,68
histidină	0,20	treonină	0,38	leucină	0,73
citrulină	0,25	prolină	0,43		

Evaluarea cantitativă a aminoacizilor. Spoturile de aminoacizi identificați pe cromatogramă (al căror contur a fost delimitat în prealabil cu creionul) se decupează, se taie în porțiuni mici și se introduc în eprubete separate. În fiecare eprubetă se adaugă 3 cm^3 alcool metilic ca eluent; astfel, colorantul reținut de fiecare spot de aminoacizi se eluează, iar extincția soluției colorate obținute după eluare se determină la spectrofotometru ($\lambda = 510$ nm).

III.4.3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUDERE MOLECULARĂ. GEL - FILTRAREA

III.4.3.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Există substanțe hidrofile de tipul dextranului (cu denumirea comercială de „Sephadex") sau poliacrilamidei („Biogel-P") care prezintă proprietatea ca în contact cu apa sau soluții saline să se îmbibe rapid, formând geluri de diferite porozități. Gelurile obținute sunt insolubile în mediu apos și stabile într-un interval larg de pH (2 - 9).

Asemenea geluri „împachetate" sub formă de coloane cromatografice sunt folosite pentru fracționarea diferitelor amestecuri de componente biochimice pe baza mărimii moleculelor, respectiv a taliei lor moleculare.

Acestea funcționează ca niște filtre sau „**site moleculare**".

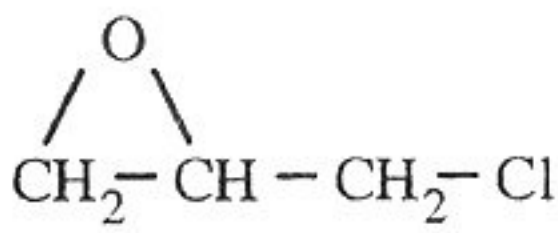
Capacitatea de filtrare moleculară (gel - filtrare) se datorează structurii chimice a Sephadexului sau Biogelului și respectiv proprietăților fizico - chimice ale gelurilor obținute. Astfel, Sephadexul este o substanță hidrofilă insolubilă, care derivă de la dextran (poliglucid pe bază de glucoză cu formula moleculară - $(C_6H_{10}O_5)_n$ - care este construit din macromolecule filiforme legate între ele încrucișat).

Dextranul este un polimer al anhidroglucozei care se obține prin fermentarea zaharozei de către diferite specii de **Leuconostoc mesenteroides**:

$$n\,C_{12}H_{22}O_{11} \xrightarrow{\text{DEXTRAN ZAHARAZA}} (C_6H_{10}O_5)_n + n\,C_6H_{12}O_6$$

zaharoză — dextran — fructoză

Sephadexul este o substanță care se obține prin combinarea dextranului cu epiclorhidrina:



care conduce la formarea de legături încrucișate între macromoleculele filiforme ale dextranului.

Prin aceste legături încrucișate se realizează o rețea („plasă") tridimensională formată din lanțuri polimere de tip poliglucidic cu grade diferite de porozitate (vezi fig.III.9.).

Formarea unui număr mare de legături încrucișate determină o structură cu rețea mai strânsă, mai compactă și deci cu un grad de porozitate mai redus; în acest caz, rezultă un gel cu porii mici și un conținut scăzut de apă reținută în interiorul rețelei. Dacă, însă, structura respectivă include un număr mai mic de legături încrucișate, atunci rezultă o rețea laxă, caracterizată printr-o porozitate mare; în acest caz, gelul prezintă pori mai largi și are un conținut mare de apă reținută între filamente.

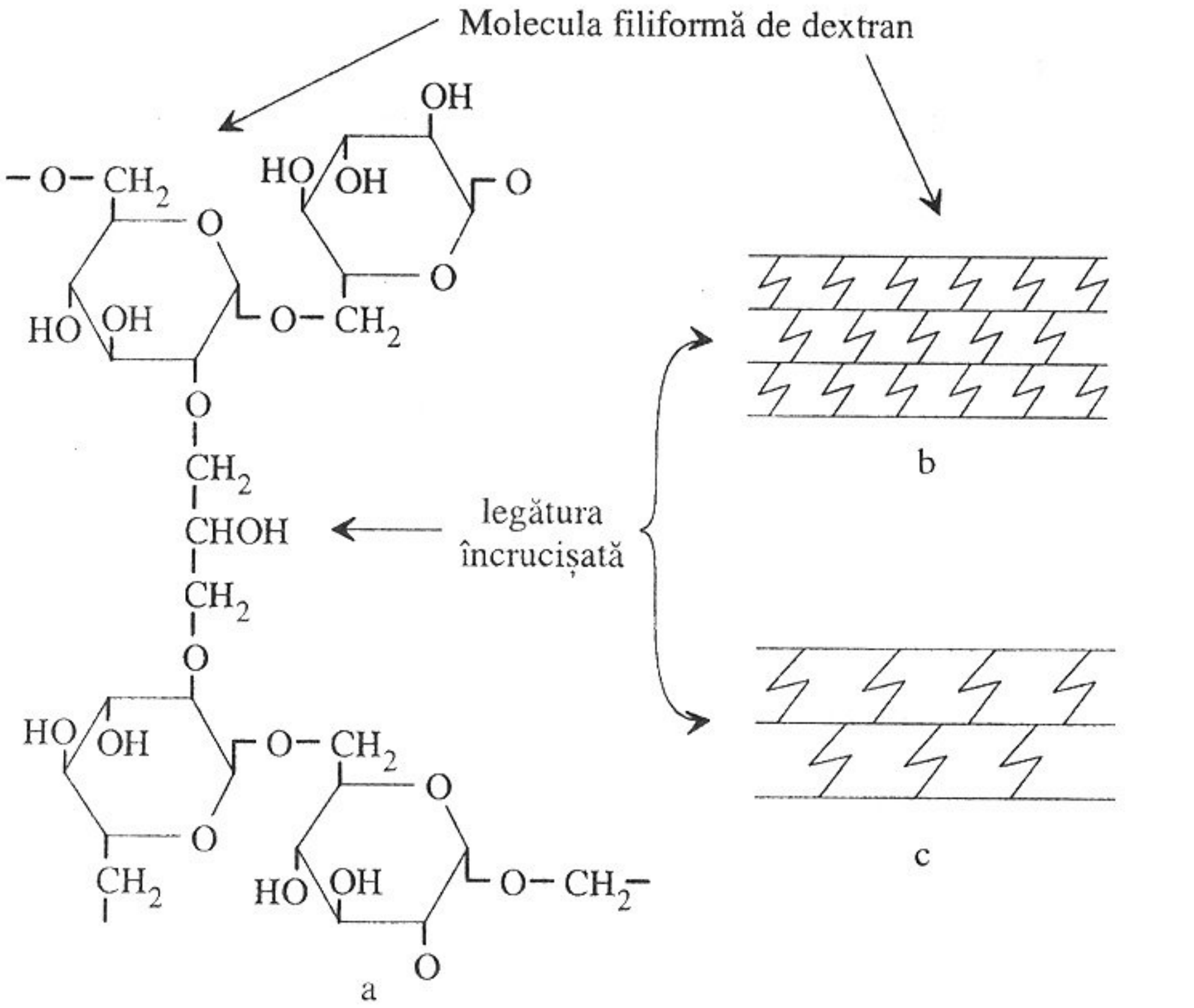


Fig.III.9. **Structura gelului de Sephadex.**
a - formula chimică; b - rețea compactă (porozitate mică);
c - rețea laxă (porozitate mare)

Filtrarea în gel reprezintă o metodă de separare cromatografică a diferitelor substanțe dintr-un amestec pe baza diferențelor de mărime (dimensiune) moleculară. Gelul are propietatea unei site moleculare („**molecular sieving**") al cărei efect se manifestă printr-o deplasare diferențiată a moleculelor care parcurg coloana de gel, în funcție de dimensiunile acestora.

În lichidul care se filtrează din coloană apar mai întâi molecule cu dimensiuni mari (nereținute), apoi cele cu dimensiuni mici (reținute). De aceea, acest procedeu de separare a componentelor pe baza diferenței de dimensiune a moleculelor poartă denumirea și de cromatografie de excludere moleculară.

III.4.3.2. TEORIA GEL - FILTRĂRII

Moleculele cu dimensiuni mici pot difuza în lichidul din interiorul particulelor care compun gelul și astfel eluția lor din coloană este întârziată sau frânată. Dimpotrivă, moleculele cu dimensiuni mari nu pot penetra particulele de gel și, în consecință, trec în faza lichidă exterioară ce înconjoară aceste particule, înaintând astfel liber prin coloană o dată cu lichidul care curge prin stratul de gel; aceste molecule mari sunt deci eluate primele din coloană, deoarece viteza lor de curgere este mai mare decât a moleculelor mici care difuzează în interiorul particulelor de gel.

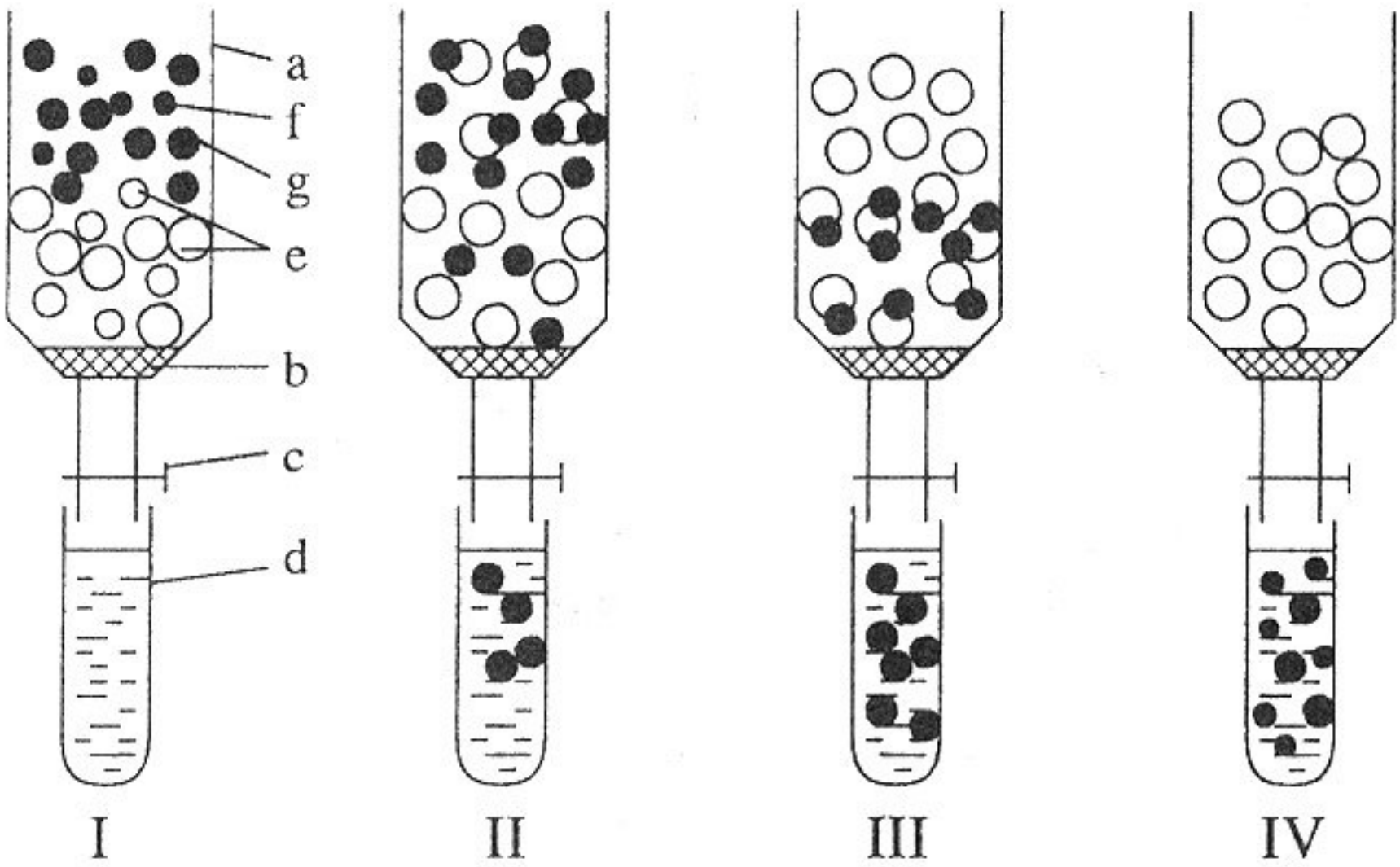


Fig.III.10. **Reprezentarea stadiilor de filtrare în gel de Sephadex.** I. Începutul filtrării în gel: a) coloană cromatografică; b) masă poroasă; c) robinet pentru reglarea debitului de curgere; d) eprubetă pentru colectarea probelor eluate; e) particule de gel; f) molecule cu dimensiune mică; g) molecule cu dimensiune mare. II. Filtrarea propriu-zisă în gel a celor două tipuri de molecule cu dimensiuni diferite. III. Separarea prin gel filtrare a moleculelor cu dimensiuni mari. IV. Separarea prin gel filtrare a moleculelor cu dimensiuni mici.

Efectul de „cernere" moleculară și, respectiv stadiile filtrării în gel se pot evidenția prin schemele indicate în figura III.10.

În funcție de dimensiunile moleculelor, fiecare substanță prezintă un anumit coeficient specific de distribuție (K_d) între faza interioară (volumul lichidului din interiorul particulelor de gel) și faza exterioară (volumul lichidului din afara acestor particule).

Substanțele cu $K_d = 0$ sunt complet excluse din lichidul existent în interiorul particulelor, pe când substanțele cu K_d cuprins între 0 și 1 sunt numai parțial excluse.

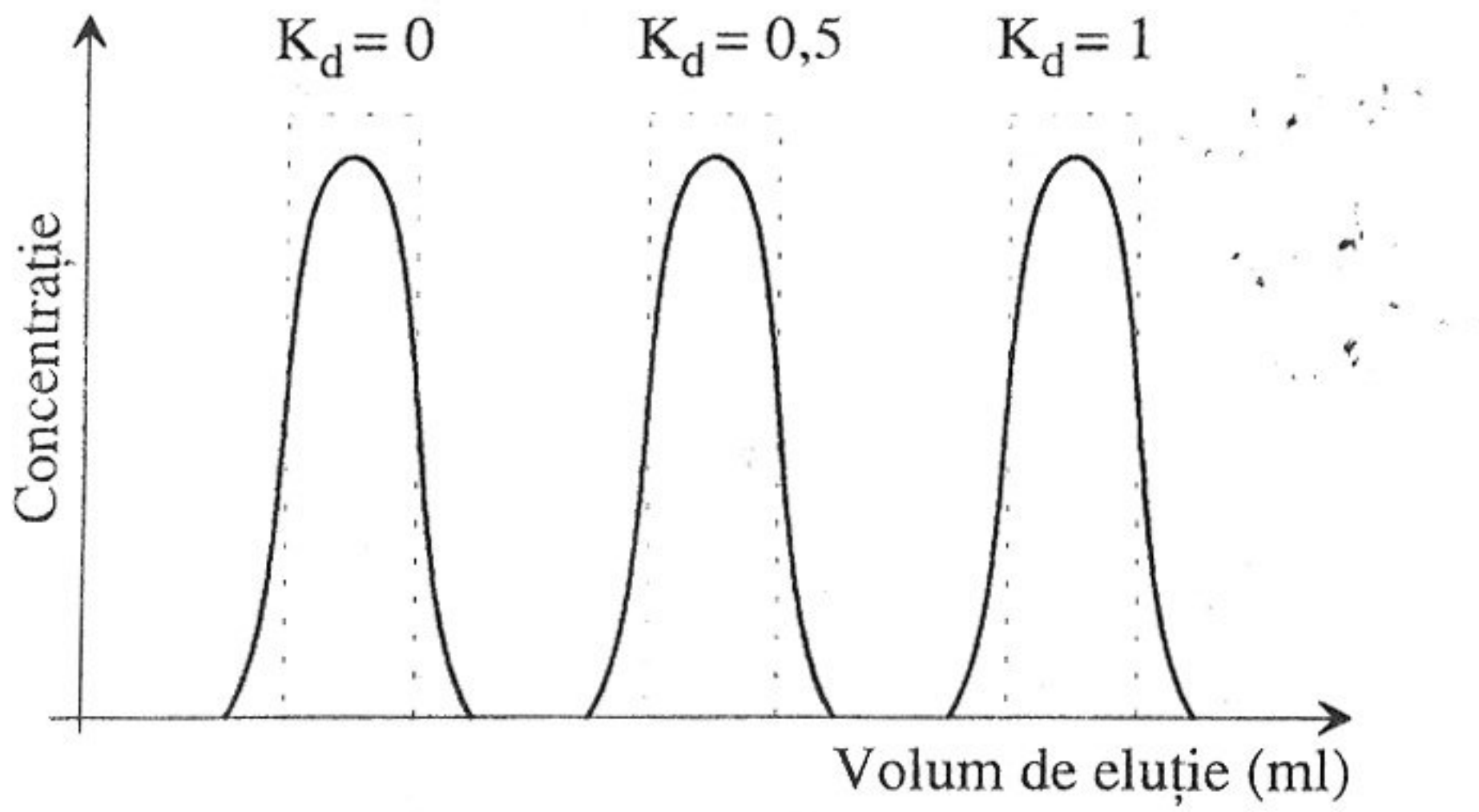


Fig.III.11. **Diagrama separării prin gel-filtrare a trei componente cu dimensiuni moleculare diferite.**

Dacă un amestec de două substanțe având molecule de mărimi diferite este supus filtrării în gel, substanța cu $K_d = 0$ va fi exclusă din coloană (eluată) după irigarea coloanei cu un anumit volum (V_0); substanța cu $K_d = 1$ va fi exclusă (eluată) din coloană abia după irigarea acesteia cu un volum suplimentar (V_i). Între acești factori există următoarea relație:

$$\mathbf{V_e = V_0 + K_d \cdot V_i}$$

în care: V_0 = volumul lichidului din afara particulelor de gel (sau „spațiul gol");

V_i = volumul lichidului din interiorul particulelor de gel;

V_e = volumul de eluție (volumul de lichid sau de eluent necesar pentru deplasarea unei substanțe de la un capăt la altul al coloanei și excluderea ei din coloană);

K_d = coeficient de distribuție.

În figura III.11. este ilustrată relația dintre valorile K_d pentru trei tipuri de molecule cu dimensiuni diferite și volumul de eluție.

Există mai multe tipuri de Sephadex care formează geluri cu porozități diferite; aceste tipuri se aleg pentru cromatografie în funcție de dimensiunile particulelor care urmează a fi separate.

TABELUL III.4. TIPURI DE SEPHADEX UTILIZAȚI PENTRU GEL - FILTRARE.

Tipul de Sephadex	Masa moleculară maximă a moleculelor reținute	Tipul de Sephadex	Masa moleculară maximă a moleculelor reținute
G - 10	700	G - 75	50000
G - 15	1500	G - 100	100000
G - 25	5000	G - 150	150000
G - 50	10000	G - 200	200000

Astfel, pentru separararea unei substanțe cu masă moleculară mică, de exemplu 5000, se va folosi Sephadex G-25, iar pentru proteine cu masa moleculară mare, de exemplu 100000 se va utiliza G-100 etc.

III.4.4. CROMATOGRAFIA PROTEINELOR PE SCHIMBĂTORI DE IONI

III.4.4.1. PRINCIPIUL ȘI MECANISMUL DE SCHIMB IONIC

Schimbătorii de ioni sunt substanțe având proprietatea de a schimba un ion propriu dintr-o grupare disociabilă a moleculei cu un alt ion din mediul lichid cu care aceste substanțe se găsesc în contact.

Schimbul de ioni reprezintă un proces reversibil ce se realizează între o fază solidă, reprezentată printr-un anumit tip de schimbător de ioni și o fază lichidă, reprezentată de macromolecule de

proteine care se comportă ca polielectroliți, în funcție de pH-ul soluției tampon în care sunt solubilizate.

Cromatografia pe schimbători de ioni implică trecerea pe o coloană încărcată cu un anumit tip de schimbător de ioni a unei probe conținând un amestec de proteine; aceste proteine sunt separate, respectiv fracționate, pe baza procesului de schimb ionic.

Mecanismul separării (fracționării) cromatografice se bazează pe stabilirea unor multiple legături de natură electrostatică între sarcinile electrice ale macromoleculelor analizate (proteine, enzime, acizi nucleici etc.) și sarcinile electrice de semn contrar ale schimbătorului de ioni.

Sub acțiunea unui eluent care conține un ion cu o afinitate mai mare pentru schimbătorul de ioni, aceste legături electrostatice pot fi desfăcute; macromoleculele sunt eliberate de pe schimbătorul de ioni și astfel eluate din coloană. Între ionul eluentului și macromoleculele legate electrostatic la suprafața schimbătorului de ioni se manifestă deci, o anumită competiție, aceste macromolecule fiind înlocuite de ionul competitiv. Există o corelație între numărul de legături electrostatice contractate de proteine cu schimbătorul de ioni și concentrația ionilor competitivi; astfel, existența unui număr mai mare de legături electrostatice reclamă concentrații mai mari ale ionilor competitivi, necesare pentru desfacerea acestor legături și implicit pentru eluția proteinei respective. Așadar, separarea (fracționarea) diferitelor tipuri de proteine, care diferă între ele prin încărcarea lor electrică sau prin distribuția diferită a sarcinilor în molecula lor necesită concentrații diferite ale ionului competitiv cu care se face eluția.

În general, separarea diferențiată a proteinelor dintr-un amestec prin cromatografie pe schimbători de ioni, respectiv stabilirea eterogenității proteinelor, se realizează pe două căi: fie prin desfacerea legăturilor dintre proteină și schimbătorul de ioni, proces determinat de creșterea concentrației ionilor competitivi (respectiv a sărurilor din eluent), fie prin reducerea numărului de sarcini electrice ale moleculelor proteice, proces determinat de modificări ale valorilor de pH.

Eluția. Reprezintă procesul prin care diferitele tipuri de proteine sunt eliberate (fracționate) succesiv de pe schimbătorul de ioni sub acțiunea unei soluții (tampon) de anumite concentrații sau cu anumite valori de pH; această soluție, denumită **eluent**, irigă coloana, anulează legăturile electrostatice stabilite între fracțiunile proteice și schimbătorul de ioni și antrenează aceste fracțiuni „eliberate" care sunt colectate.

Eluția se poate realiza prin două procedee și anume: **eluție în gradient** (sau de tip continuu) și **eluție în trepte** (sau de tip discontinuu).

Eluția în gradient continuu se efectuează în diferite variante, ca de exemplu:

➢ creșterea continuă a „tăriei ionice" a tamponului de eluție, cu menținerea constantă a pH-ului;

➢ creșterea continuă a tăriei ionice a tamponului și scăderea concomitentă a pH-ului;

➢ variația pH-ului și menținerea constantă a tăriei ionice.

Caracteristic eluției în gradient continuu este modificarea lentă, progresivă, discretă în decursul cromatografiei a unuia sau a ambilor parametri (tărie ionică, pH).

În mod practic, efectuarea eluției în gradient continuu implică existența a două vase care comunică între ele; un vas rezervor care conține o soluție mai concentrată sau de pH diferit și un vas de amestecare (prevăzut cu un agitator magnetic) care conține soluția inițială de eluție (tamponul de echilibrare) și care este conectat la coloana cromatografică; volumul de eluent din vasul de amestecare care pătrunde în coloană este imediat înlocuit de un volum de tampon corespunzător provenit din vasul rezervor. Se realizează, astfel, o variație continuă, în gradient, a concentrației sau a pH-ului eluentului (grafic, gradientul realizat poate avea o formă liniară, concavă sau convexă).

Eluția în trepte (discontinuă) implică adăugarea intermitentă, la anumite intervale, de volume fixe de eluent cu tărie ionică sau/și pH diferit, ceea ce determină o eluție treptată, discontinuă a fracțiunilor proteice prin desfacerea legăturilor cu schimbătorul de ioni.

Eluția în trepte sau discontinuă se poate realiza în diferite variante ca:

- variația tăriei ionice a tamponului și menținerea constantă a pH-ului;
- creșterea tăriei ionice a tamponului și scăderea pH-ului;
- creșterea tăriei ionice și a pH-ului tamponului.

III.4.4.2. TIPURI DE SCHIMBĂTORI DE IONI

Tipurile de schimbători de ioni se clasifică în funcție de comportarea lor în procesele de schimb ionic și de natura substanțelor (suporturilor) pe care sunt grefate grupările active de schimb ionic.

După comportarea în procesele de schimb ionic, schimbătorii de ioni se clasifică în: **cationiți** și **anioniți**.

Cationiții, sau schimbătorii de ioni cu proprietăți acide, sunt de două tipuri:

- slab acizi, cu gruparea activă $R-COO^-$;
- puternic acizi, cu gruparea activă $R-SO_3^-$.

Anioniții, sau schimbătorii de ioni cu proprietăți bazice, sunt de două tipuri:

- slab bazici, cu gruparea activă $R_2-\overset{+}{N}H$;
- puternic bazici, cu gruparea activă $R_3-\overset{+}{N}$.

După natura substanțelor pe care sunt grefate grupările acide, schimbătorii de ioni se încadrează în diferite categorii, ca de exemplu: schimbători de ioni pe bază de celuloză (Cellex), schimbători de ioni pe bază de dextran (Sephadex) și rășini schimbătoare de ioni (tip polistiren, tip poliacrilic sau tip fenolic).

Schimbători de ioni pe bază de celuloză, amiloză, amilopectină. Se obțin prin grefarea diferitelor grupări polare, ionizabile în macromolecula de celuloză, amiloză sau amilopectină, ceea ce conferă acestora o capacitate mai mare de schimb ionic. Legăturile formate sunt de tip ester, iar matricea schimbătorului de ioni respectiv formează un material foarte hidrofil și permeabil, care permite o filtrare ușoară a tamponului de eluție.

Schimbătorul de ioni rezultat prin introducerea unor asemenea grupări în macromolecula de celuloză, de exemplu, poartă denumirea grupărilor ionizabile active introduse în structura celulozei pentru a-i mări capacitatea de schimb ionic. Exemple: DEAE-celuloza, care conține grupările dietil-amino-etil; CM-celuloza, care conține grupările carboxil-metil; SE-celuloza, care conține grupările sulfo-etil etc.

În funcție de natura acestor grupări, schimbătorii celulozici anionici pot avea un caracter puternic (DEAE-celuloza), moderat sau slab bazic, iar cei cationici un caracter puternic (SE-celuloza), moderat sau slab acid (CM-celuloza).

Prin trecerea pe coloană, diferite biomacromolecule ca proteinele, enzimele, acizii nucleici sunt absorbite pe schimbătorul de ioni prin desfacerea prealabilă a legăturilor de tip ester. Eluția în anumite condiții de pH și tărie ionică permite o separare, respectiv o fracționare selectivă a diferitelor tipuri de molecule dintr-o populație moleculară eterogenă.

Schimbători de ioni pe bază de Sephadex. Se obțin prin introducerea în molecula de dextran (Sephadex G-25, Sephadex G-50) a grupărilor ionizabile DEAE (dietil-amino-etil), CM (carboxil-metil) și SE (sulfo-etil). În contact cu apa sau cu soluții saline, acești schimbători de ioni se îmbibă rapid și formează geluri insolubile, stabile în soluții alcaline și slab acide, având proprietăți de schimb ionic.

Răşini schimbătoare de ioni. Se obţin prin copolimerizarea stirenului sau a acidului acrilic cu divinil-benzenul (agent de introducere în moleculă a unor legături încrucişate); răşinile astfel obţinute formează o reţea tridimensională cu proprietăţi de schimb ionic, conform reacţiilor generale:

TABELUL III.5. RĂŞINI SCHIMBĂTOARE DE IONI.

Tipul	Reacţia
$CATIONIT - RH^+$	$RH^+ + NaCl \rightarrow RNa^+ + HCl$
$-RNa^+$	$RH^+ + NaOH \rightarrow RNa^+ + HOH$
$ANIONIT - ROH^-$	$ROH^- + NaCl \rightarrow RCl^- + NaOH$
$-RCl^-$	$ROH^- + HCl \rightarrow RCl^- + HOH$

Răşinile cu cea mai largă utilizare în cromatografie sunt cunoscute sub numele de „Amberlit", „Dowex", „Zerolit".

Schimbătorii de ioni prezintă o deosebită importanţă în biochimia analitică şi preparativă modernă, fiind utilizaţi pentru **separarea**, **izolarea**, **purificarea** şi **caracterizarea** unor componente biochimice ca: peptide, proteine, enzime, acizi nucleici, poliglucide etc.

III.5. METODA FLAMFOTOMETRICĂ

Flamfotometria este una din metodele de analiză cantitativă rapidă şi precisă, utilizată în scopul dozării electroliţilor din lichidele biologice. Aplicabilitatea practică a acestei metode este limitată în special la metalele alcaline şi alcalino-teroase, dar pentru faptul că necesită o aparatură relativ simplă este utilizată în majoritatea laboratoarelor clinice.

Principiul metodei. Flamfotometria (fotometria cu flacără) se bazează pe înregistrarea spectrelor de emisie ale diferitelor elemente, excitate în flacără, cu ajutorul unei celule fotoelectrice.

Este cunoscut faptul că, excitarea în fază gazoasă a unui atom oarecare prin intermediul unei surse de energie (arc electric, flacără, scânteie electrică) dă naștere la un spectru de emisie continuu atât în domeniul vizibil, cât și în infraroșu sau ultraviolet. În momentul excitării, prin absorbție de energie atomii trec de la starea lor fundamentală cu un nivel energetic mai scăzut la o stare excitată bogată în energie, care durează o perioadă foarte scurtă de 10^{-7} - 10^{-8} secunde; în timpul revenirii la starea fundamentală, energia absorbită este emisă sub formă de spectre de emisie. Toate tipurile de flamfotometrie funcționează pe baza aceluiași principiu.

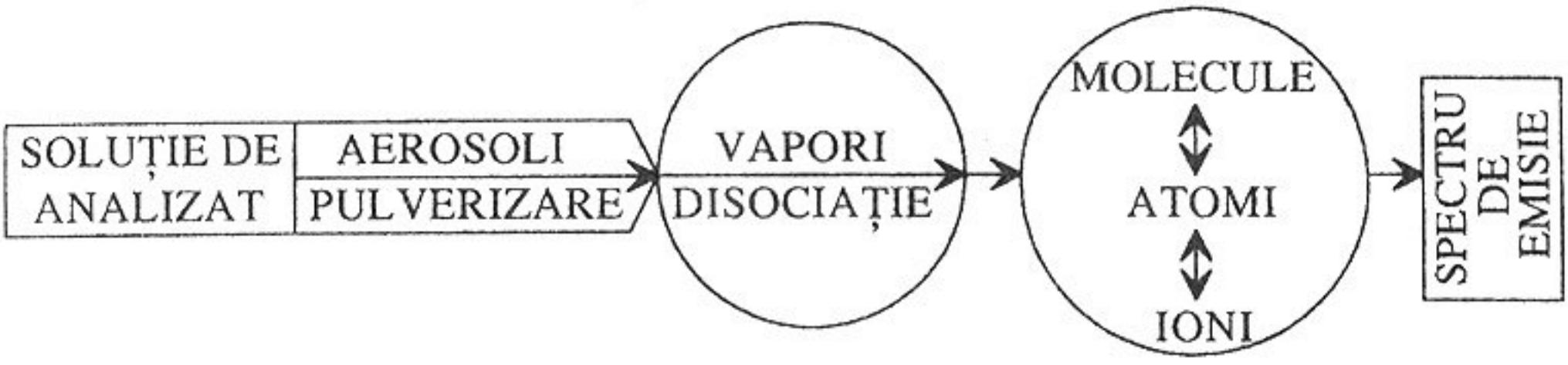


Fig.III.11. **Schema procesului de pulverizare în arzător.**

Principiul de funcționare al fotometrului cu flacără.

Soluția de analizat se pulverizează într-un dispozitiv special (pulverizator) și se introduce sub formă de aerosoli în flacăra unui arzător special (Brenner); soluția salină sub formă de aerosoli suferă diverse transformări: apa din soluție se evaporă, iar substanța dizolvată se transformă în molecule gazoase, care ulterior se vor disocia.

Prin excitarea în flacără a acestui amestec complex iau naștere spectre de emisie care sunt focalizate pe o celulă fotoelectrică, după ce în prealabil au fost trecute printr-un sistem optic de izolare a luminii monocromatice. Proiectarea fluxului luminos pe celula fotoelectrică dă naștere unui fotocurent care se măsoară cu ajutorul unui galvanometru.

Intensitatea fotocurentului este proporțională cu concentrația elementului respectiv din soluție. Flamfotometrele cu filtru sunt dintre cele mai utilizate.

Componentele flamfotometrului cu filtru sunt următoarele:

◆ **pulverizatorul** este confecționat din sticlă de cuarț sau material plastic și are rolul de a pulveriza în picături foarte fine soluția de analizat;

◆ **arzătorul** este dispozitivul cu flacără în care substanța de analizat se vaporizează și se excită emanând spectrele de emisie. În funcție de temperatura necesară pentru excitarea substanței de analizat se utilizează diverse amestecuri de gaze. În funcție de potențialul de ionizare al elementului care urmează a fi determinat se alege și temperatura dorită (Na și K 1925ºC, iar Ca și Mg 3100ºC).

TABELUL III.6. **TEMPERATURILE DIVERSELOR AMESTECURI DE GAZE.**

Amestec de gaze	**Temperatura (ºC)**	**Amestec de gaze**	**Temperatura (ºC)**
Gaz de iluminat - aer	1700 - 1840	Hidrogen - oxigen	2550 - 2660
Propan - aer	1925	Propan - oxigen	2850
Hidrogen - aer	2000 - 2045	Acetilenă - oxigen	3100 - 3137
Acetilenă - aer	2125 - 2397		

► **filtre selective de lumină** - un sistem optic permeabil pentru lumina emisă de elementul ce urmează a fi determinat și impermeabil pentru lumina emisă de celelalte elemente, care este confecționat din sticlă colorată;

► **celula fotoelectrică** - trebuie să fie sensibilă și constantă pentru un domeniu larg de lungimi de undă și se realizează pe bază de cesiu-oxigen sau stibiu-cesiu;

► **galvanometrul** - al cărui rol este acela de a măsura fotocurentul produs de celula fotoelectrică.

Metoda flamfotometrică este aplicabilă numai pentru dozarea elementelor care au energie de excitare scăzută (**Na**, **K**, **Ca**, **Mg**). Tehnica de lucru corespunzătoare fiecărui tip de flamfotometru este indicată în instrucțiunile livrate odată cu aparatul.

IV. MATERIALE BIOLOGICE

IV.1. SÂNGELE

IV.1.1. GENERALITĂȚI. FUNCȚIILE SÂNGELUI

Materia vie își desfășoară procesele fizico - chimice și biologice într-un lichid interstițial denumit **mediu intern**. Mediul intern cuprinde: sânge, limfă, lichid cefalo-rahidian, umoare apoasă etc.

Sângele este un țesut fluid complex care se compune din celule sau elemente figurate în suspensie într-un mediu lichid numit **plasmă**. Schematic compoziția sângelui poate fi astfel prezentată (tabelul IV.1.).

TABELUL IV.1. **COMPOZIȚIA SÂNGELUI.**

Elemente figurate 45%	**Plasma 55%**
◆ eritrocite; ◆ leucocite; ◆ trombocite.	► apa 91 - 92%; ► reziduu 8 - 9%; ■ substanțe bioorganice; ■ substanțe bioanorganice.

Prin permanenta circulație în sistemul vascular, sângele asigură integrarea tuturor țesuturilor și organelor într-un sistem unitar și independent.

Orice modificare față de limitele normale a componentelor sângelui, celulare sau plasmatice, reprezintă o tulburare a echilibrului dintre funcțiile tuturor organelor, o modificare **biopatologică** pe care o **denumim boală internă**, care evoluează cu modificări sanguine ce pot fi puse în evidență prin investigații de laborator.

În organism plasma îndeplinește următoarele funcții:

I. **Funcția de transport** a componentelor necesare vieții celulare prin care se realizează:

- **nutriția**, prin transportul substanțelor nutritive de la nivelul tractului digestiv spre toate țesuturile pentru a fi catabolizate, depozitate sau pentru a fi utilizate în procese anabolice (glucoza, acizii grași liberi, aminoacizii);
- **oxidarea**, prin transportul oxigenului de la alveolele pulmonare la celulele tuturor organelor și țesuturilor și al dioxidului de carbon de la țesuturi la plămâni;
- **excreția**, prin transportul cataboliților formați în cursul metabolismelor spre organele excretoare (piele, plămâni, rinichi, intestin) pentru a fi eliminați;
- **reglare metabolică**, prin transportul hormonilor, vitaminelor, pentru reglarea unor funcții ale organelor și țesuturilor.

II. **Funcția de menținere** între limite constante a proprietăților fizico - chimice ale mediului intern (izohidrie, izoionie, izotonie, izotermie, reglarea echilibrului acido - bazic):

- apa și ionii din organismul uman circulând continuu între plasmă, lichidul intersițial și organe sau țesuturi, realizează un echilibru hidro - electrolitic;
- datorită marii cantități de proteine din compoziția sa, sângele își menține presiunea oncotică la un nivel constant, ceea ce face posibil schimbul permanent al apei între compartimentul vascular și spațiile interstițiale;
- prin conținutul său mare în apă - substanță cu o mare căldură specifică - și prin circulația sa rapidă, distribuie căldura tuturor organelor și țesuturilor;
- datorită sistemelor sale tampon se menține constant echilibrul acido - bazic al sângelui, precum și al mediului intern.

III. **Funcția imunologică** se realizează prin intermediul leucocitelor și anticorpilor circulanți care contribuie la apărarea organismului împotriva infecțiilor.

Prin aceste funcții, sângele stabilește interrelații între organe, intervine în reglarea funcțiilor acestora și este un mijloc important al asigurării unității funcționale a organismului.

IV.1.2. RECOLTAREA SÂNGELUI

Analizele curente de laborator se pot realiza pe **sânge venos**, **capilar** sau **arterial**:

► **sângele venos** se poate recolta din venele plicii cotului (adult), cu ajutorul unei seringi curate, uscate și sterile. Înaintea puncționării se fixează garoul deasupra cotului sau a locului de unde vrem să recoltăm sânge și se dezinfectează tegumentul cu alcool 70%;

► **sângele capilar** se recoltează din pulpa degetului, din călcâi sau lobul urechii și se folosește pentru metodele microanalitice;

► **sângele arterial** se recoltează din artera femurală în condiții speciale și numai atunci când se determină pH-ul sau gazele din sânge.

Investigațiile comparative pe sânge capilar și venos au arătat că pentru următoarele substanțe: sodiu, potasiu, clor, calciu, fosfor, colesterol, uree, proteine totale nu există diferențe semnificative. Pe de altă parte, pentru glucoză s-au găsit valori mai mici în sângele venos față de cel arterial, pentru piruvat și lactat valori mai mari în sângele venos, decât în cel capilar, iar pentru amoniac valori mai mari în sângele arterial decât în sângele venos.

Recoltarea se face de către personal medical pregătit care recurge la o tehnică corectă și respectă indicațiile și contraindicațiile explorărilor biochimice.

Tuburile în care se recoltează sângele trebuie să fie degresate, foarte bine spălate și uscate, întrucât urmele de alcool, apă etc. pot produce hemoliza sângelui, iar diferitele impurități pot falsifica rezultatele dozărilor.

Se preferă tuburile de sticlă și nu de material plastic, deoarece în acestea din urmă cheagul aderă puternic de pereți, se detașează greu, serul se formează târziu și se produce hemoliza.

Condițiile de pregătire a pacientului în vederea recoltării sângelui solicită cunoștințe exacte asupra factorilor nepatologici care influențează compoziția sângelui ca: dieta, medicația, eforturile fizice, starea de oboseală fizică sau psihică, temperatura ambiantă, poziția corpului. În mod curent se recomandă ca recoltarea sângelui să se efectueze dimineața „à jeun" (pe nemâncate).

IV.1.3. PLASMA ȘI SERUL

Plasma reprezintă partea lichidă a sângelui care vehiculează elementele figurate și posedă o compoziție complexă. Prin recoltarea sângelui pe un anticoagulant, după câteva ore (sau prin centrifugare) acesta se separă în două părți distincte: un sediment format din elemente figurate și un lichid (supernatantul) limpede, gălbui, care este plasma.

Sângele recoltat fără anticoagulant, în aceleași condiții, prezintă și el două porțiuni: un cheag format din elementele figurate și fibrină și o componentă lichidă limpede, numită, în acest caz, **ser**.

Prin urmare, atât plasma, cât și serul reprezintă porțiunea lichidă a sângelui, lipsită total de celulele sanguine care sunt înlăturate prin centrifugare sau prin decantare în timp.

Coagularea este un proces enzimatic complex prin care fibrinogenul - proteină solubilă în plasmă, se transformă în fibrină - proteină insolubilă (formează cheagul).

Așadar, plasma conține în plus față de ser factorii coagulării și fibrinogenul; în afara acestor deosebiri cele două lichide au o compoziție identică. Deci:

Plasmă = ser + fibrinogen + factorii coagulării.

În condiții fiziologice, aspectul serului poate fi:

- **galben pai** și **limpede** - serul normal;
- **opalescent,** datorită particulelor de gliceride provenite dintr-un regim foarte bogat în lipide;
- **galben brun,** datorită substanțelor carotenoide provenite din alimentație excesiv vegetariană;

◆ de la **roz** la **roșu intens,** din cauza hemoglobinei ca rezultat al hemolizei datorate unor erori în tehnica de recoltare a sângelui.

În condiții patologice, serul poate prezenta următoarele modificări de culoare:

► **opalescent** - în nefroza lipoidică;

► **galben brun** - în ictere de diferite etiologii.

În funcție de tipul analizei care urmează a fi efectuate examenul biochimic al sângelui se practică pe **ser** și **plasmă**, mai rar pe **sânge integral**.

IV.1.4. ANTICOAGULANȚI

Coagularea sângelui reprezintă un proces natural de apărare a organismului împotriva hemoragiilor. Orice leziune care poate provoca scurgerea sângelui din vasele sanguine este blocată prin formarea unui cheag (tromb) rezultat prin coagularea, mai mult sau mai puțin spontană a sângelui.

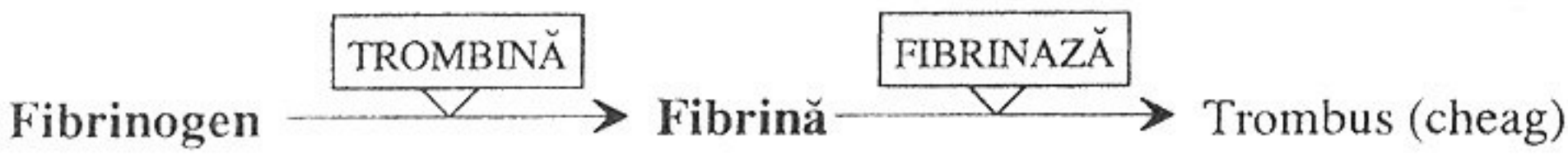
Procesul de coagulare a sângelui este un mecanism complex, în care sunt implicați 12 factori cu roluri diferite.

În principiu, procesul de coagulare se bazează pe transformarea **fibrinogenului** (solubil) în **fibrină** (insolubilă) sub acțiunea **trombinei** care acționează ca o enzimă proteolitică.

În acest proces, mai intervine și **fibrinaza**, enzimă care favorizează polimerizarea monomerilor din care este alcătuită fibrina și depunerea acesteia sub formă de filamente insolubile. Aceste filamente formează un gel denumit **tromb** sau **cheag** care are proprietatea de a fixa în structura sa restul de masă sanguină.

Prin contracția filamentelor de fibrină cheagul expulzează serul sanguin care include toate componentele chimice ale plasmei, mai puțin fibrinogenul și alți factori de coagulare.

O schemă simplă a coagulării sângelui este următoarea:



Un rol important în coagularea sângelui îl dețin ionii de calciu.

Pentru efectuarea analizelor biochimice pe plasmă, sângele trebuie să fie recoltat pe anticoagulanți, substanțe care au proprietatea de a inhiba coagularea sângelui.

Cei mai mulți dintre anticoagulanți acționează blocând ionii de calciu, așa după cum urmează:

◆ **oxalatul de sodiu**, potasiu sau litiu prin fixarea ionilor de calciu din sânge sub formă de oxalat de calciu insolubil conform reacției:

$$C_2O_4Na_2 + Ca^{2+} \rightarrow C_2O_4Ca + 2\,Na^+$$

◆ **citratul de sodiu** acționează deasemenea prin blocarea ionilor de Ca^{2+} din sânge:

$$C_6H_7O_7Na + Ca^{2+} \rightarrow C_6H_6O_7Ca + Na^+$$

◆ **EDTA** (Etilendiaminotetraacetat - sare disodică) acționează ca un anticoagulant, dat fiind proprietatea sa de a complexa ionii de calciu din sânge;

◆ **fluorura de sodiu** (NaF) își exercită acțiunea anticoagulantă prin legarea ionilor de calciu sub formă de CaF_2 (insolubilă):

$$2\,NaF + Ca^{2+} \rightarrow CaF_2 + 2\,Na^+$$

◆ cel mai important anticoagulant este **heparina**, un proteoglican sintetizat de mastocite - celule situate în vecinătatea vaselor de sânge.

Anticoagulanții cei mai utilizați sunt prezentați în tabelul IV.2.

Acțiunea anticoagulantă este explicabilă prin inhibarea activării protrombinei, a transformării acesteia în trombină și, deci, a conversiei fibrinogenului în fibrină. **Heparina** este un **anticoagulant fiziologic ideal**, deoarece nu modifică starea fizico-chimică a sângelui.

TABELUL IV.2. **TIPURI DE ANTICOAGULANȚI UTILIZAȚI ÎN LABORATORUL CLINIC.**

Anticoagulant	Preparare	Potrivit la dozări de	Nu este adecvat pentru dozarea
Soluție ACD	◆ acid citric 4,7 g ◆ citrat trisodic 16 g ◆ glucoză ◆ apă distilată 1000 ml ◆ 1 ml ACD/4 ml sânge	Enzime eritrocitare	• electroliți • metaboliți • ureea cu urează
Citrat de Na, K	◆ 1 parte dintr-o soluție 3,8% de citrat de Na ◆ 9 părți sânge	Fibrinogen Metaboliți	• electroliți • enzime • VSH
EDTA sodic	◆ 300 mg sare disodică dihidratată a EDTA în 20 ml apă bidistilată ◆ 0,1 ml / 2 ml sânge	Fibrinogen Metaboliți	• Hemograma • electroliți • N-rezidual • ceruloplamina • fosfataza alcalină și acidă
Heparinat de Na, K, Li, NH^+_4	◆ 60 mg / 20 ml apă bidistilată ◆ 0,1 ml / 2 ml sânge	Enzime Metaboliți	• electroliți • fosfataza alcalină • amoniac
Fluorura de sodiu	◆ 2 mg NaF/1 ml sânge	Glicemie	• glicoliza eritrocitară • ureea cu ureaza
Oxalat de Na, K, Li	◆ 300 mg / 20 ml apă bidistilată ◆ 0,1 ml / 2 ml sânge	Fibrinogen Metaboliți	• LDH • electroliți • pH
Amestec Wintrobe	◆ 1,2 g oxalat de amoniu ◆ 0,8 g oxalat de potasiu ◆ apă bidistilată 100 ml	Fibrinogen Metaboliți	• enzime • electroliți
Amestec Fleury	◆ 6 g oxalat de potasiu ◆ 4 g fluorură de sodiu ◆ 6 mg /1 ml sânge	Fibrinogen Metaboliți Glucoză	• enzime • electroliți • ureea cu urează

Modalitatea de utilizare a anticoagulanților este diferită, în funcție de solubilitatea fiecăruia.

Atunci când este necesară utilizarea oxalatului este de preferat oxalatul de potasiu care are avantajul unei solubilități superioare, comparativ cu sărurile sale de litiu sau sodiu.

Dacă anticoagulantul este solubil în apă, se folosește sub formă de pulbere introdusă în tubul de recoltare, asigurându-se că prin amestecare cu sângele el se dizolvă în timpul cel mai scurt.

Nu este permisă accelerarea dizolvării prin astuparea eprubetei cu degetul și răsturnarea ei. Pentru evitarea coagulării este absolut necesară agitarea imediată și energică a sângelui în prezența anticoagulantului. În cazul heparinei sau soluțiilor de anticoagulanți, în prealabil se spală tubul de recoltare cu o mică porțiune lichidă, după care se usucă.

Utilizarea anticoagulanților trebuie să se facă la indicația laboratorului, în funcție de dozările cerute pentru precizarea diagnosticului.

IV.1.5. COMPOZIȚIA SÂNGELUI

Sângele prezintă o compoziție de o constanță deosebită, cu toate aporturile anabolice și deșeurile catabolice care intră sau ies din sânge în mod continuu.

Nivelul fiecărui constituent al său este menținut între limite de variație foarte strânse prin mecanisme reglatoare al căror ansamblu a fost numit de Canon - **homeostazie**.

Fiecare constituent plasmatic (seric) se găsește într-un echilibru dinamic, oscilând între limite mici în jurul unei medii care este caracteristică fiecăruia în parte, depinzând de vârstă, sex, caracteristici individuale, alimentație etc.

Principalii constituenți dozați în laboratorul clinic în plasmă (P) sau ser (S) și valorile lor limită sunt prezentate în tabelul IV.3.

TABELUL IV.3. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A PLASMEI.

Parametri	Valori normale - unități de greutate la dl (100 ml)	Valori normale în unități moleculare
I. SUBSTANȚE MINERALE		
◆ sodiu	308 - 340 mg	134 - 148 mmol/l
◆ potasiu	13,3 - 17,6 mg	3,4 - 4,5 mmol/l
◆ calciu total	9 - 11 mg	2,25 - 2,75 mmol/l
◆ calciu ionic	4,3 - 6,3 mg	1,07 - 1,58 mmol/l
◆ magneziu	1,9 - 2,9 mg	0,78 - 1,19 mmol/l
◆ clor	339 - 394 mg	95 - 111 mmol/l
◆ fosfor	2 - 5 mg	0,65 - 2,3 mmol/l
◆ fier	80 - 140 µg	14,3 - 21,5 µmol/l
II. SUBSTANȚE BIOORGANICE		
A. **Glucide și metaboliți**		
• glucoză	60 - 100 mg	3,33 - 5,5 mmol/l
• acid lactic	5,7 - 22 mg	0,63 - 2,2 mmol/l
• acid piruvic	0,3 - 0,9 mg	34 - 102 µmol/l
B. **Lipide**		
■ lipide totale	500 - 800 mg	5 - 8 g/l
■ colesterol total	100 - 250 mg	2,6 - 6,5 mmol/l
■ triacilgliceroli	74 - 172 mg	0,85 - 1,97 mmol/l
■ fosfolipide	150 - 250 mg	1,94 - 3,23 mmol/l
■ acizi grași liberi	8,5 - 11,5 mg	0,3 - 0,48 mmol/l
C. **Proteine și cataboliți**		
► proteine totale	6,5 - 8,5 g	65 - 85 g/l
► albumine	3,5 - 5,5 g	35 - 50 g/l
► globuline	1,5 - 3,5 g	15 - 35 g/l
► fibrinogen	200 - 400 mg	5,88 - 11,76 µmol/l
► ureea	15 - 40 mg	2,5 - 6,66 mmol/l
► creatinina	0,4 - 1,2 mg	35,4 - 106 µmol/l
► acidul uric	3 - 7 mg	119 - 416 µmol/l
► bilirubina totală	- 1 mg	- 17,1 µmol/l
► bilirubina directă	- 0,25 mg	- 4,28 µmol/l
► aminoacizi liberi		2,32 - 4,05 mmol/l

IV.1.6. SURSE DE ERORI ÎNTÂLNITE ÎN DETERMINĂRILE BIOCHIMICE

IV.1.6.1. HEMOLIZA

Lizarea hematiilor manifestată prin modificarea culorii serului de la galben la roșu, reprezintă o sursă de erori semnificative în majoritatea analizelor biochimice, mai ales în cazul constantelor biochimice a căror concentrație intraeritrocitară este mai mare decât în plasmă. De asemenea, culoarea serului hemolizat, datorită absorbției hemoglobinei (405 nm), poate vicia unele determinări colorimetrice efectuate fără deproteinizare, ceea ce impune efectuarea unui blanc (probă în alb), cum ar fi, de exemplu, la dozarea bilirubinei, colesterolului, creatininei, lipidelor totale etc.

TABELUL IV.4. RAPORTUL DE CONCENTRAȚIE AL UNOR COMPONENTE ÎN ERITROCITE ȘI PLASMĂ.

Componente	Raport E/P	Componente	Raport E/P
◆ lactat dehidrogenaza	160/1	◆ glucoză	0,82/1
◆ fosfataza acidă	67/1	◆ colesterol	0,72/1
◆ transaminaza GOT	20/1	◆ K^+	22/1
◆ transaminaza GPT	6,7/1	◆ Na^+	10/1
◆ creatinina	1,8/1	◆ Cl^-	12/1

Pentru prevenirea hemolizării sângelui se recomandă folosirea de eprubete uscate, evitarea unei aspirări sau agitări puternice, evitarea unei staze venoase prelungite sau puternice.

Erori intens semnificative sunt semnalate în dozarea unor anumite componente prezentate în tabelul IV.4.

IV.1.6.2. SERUL SAU PLASMA ICTERICĂ

Culoarea caracteristică serurilor icterice, datorită prezenței într-o concentrație crescută a bilirubinei, interferă semnificativ în

determinările colorimetrice care se efectuează la o lungime de undă cuprinsă între 400 - 500 nm. În acest caz se face o probă blanc a serului.

IV.1.6.3. SERUL SAU PLASMA LIPEMICĂ

Atunci când concentrația lipidelor neutre din plasmă depășește 700 mg%, aceasta are un aspect **lactescent**. Dacă în timpul determinării respective opalescența nu dispare, extincția va fi mult crescută, pentru citirile în domeniul 300 - 500 nm. În aceste cazuri se efectuează un blanc al plasmei astfel: la volumul de plasmă indicat pentru determinare se adaugă **ser fiziologic** (NaCl 0,85 g%) până la completarea volumului final de reactivi indicat în metoda respectivă; se citește extincția care se va scădea din cea a probei de ser respectiv.

IV.1.7. CONSERVAREA SERULUI SAU PLASMEI

În general, la temperatura laboratorului, nu se produc modificări esențiale ale concentrației sau activității componentelor biochimice ale serului timp de 4 - 6 ore. Serul sau plasma se poate conserva la + 4ºC timp de 24 - 36 ore fără a se produce modificări semnificative, cu excepția unor enzime, electroliți și metaboliți.

Atunci când este necesară o conservare mai îndelungată, serul sau plasma se congelează la - 20ºC sau se liofilizează, condiții în care componentele cu masă moleculară mică nu se modifică, cu excepția glucozei. O serie de componente, mai ales unele enzime, nu pot fi menținute nici în aceste condiții fiind necesară determinarea lor imediat după recoltare.

Pentru a inhiba dezvoltarea bacteriilor în probele conservate mai mult de 24 de ore, se adaugă un mg streptomicină / 10 ml sânge.

IV.2. URINA

IV.2.1. GENERALITĂȚI DESPRE FUNCȚIILE RINICHILOR

Funcția de excreție a rinichiului, concretizată prin elaborarea urinei, se datorește rolului acestui organ de a menține între anumite limite volumul, presiunea osmotică, echilibrul acido - bazic și compoziția chimică a lichidelor din organism prin eliminarea produșilor care apar în exces, a substanțelor exogene sau chiar toxice introduse accidental în organism.

Rinichiul este deci, principalul organ al tranzitului hidric și prin aceste funcții menține **homeostazia** organismului.

Aceste funcții sunt realizate de rinichi prin următoarele procese fundamentale:

- circulația sanguină renală;
- filtrarea glomerulară;
- reabsorbția selectivă și secreția tubulară.

IV.2.1.1. CIRCULAȚIA SANGUINĂ RENALĂ

Rinichii reprezintă 0,4% din greutatea corporală, dar dispun de o irigație impresionant de mare fiind capabili să filtreze în medie pe zi 1500 l de sânge, fluxul sanguin renal fiind de 900 - 1200 ml sânge/ minut. Această cantitate de sânge este inegal distribuită: zona corticală primește 70 - 80%, iar cea medulară restul. Datorită vascularizației diferențiate atât din punct de vedere topografic, cât și funcțional, circulația sanguină renală se clasifică în **pre** și **post glomerulară**.

Unitatea morfo-funcțională în care se formează urina este **nefronul** (rinichiul conține aproximativ un milion de nefroni) a cărui reprezentare schematică anatomică și funcțională este ilustrată în figura IV.1. (după Harper).

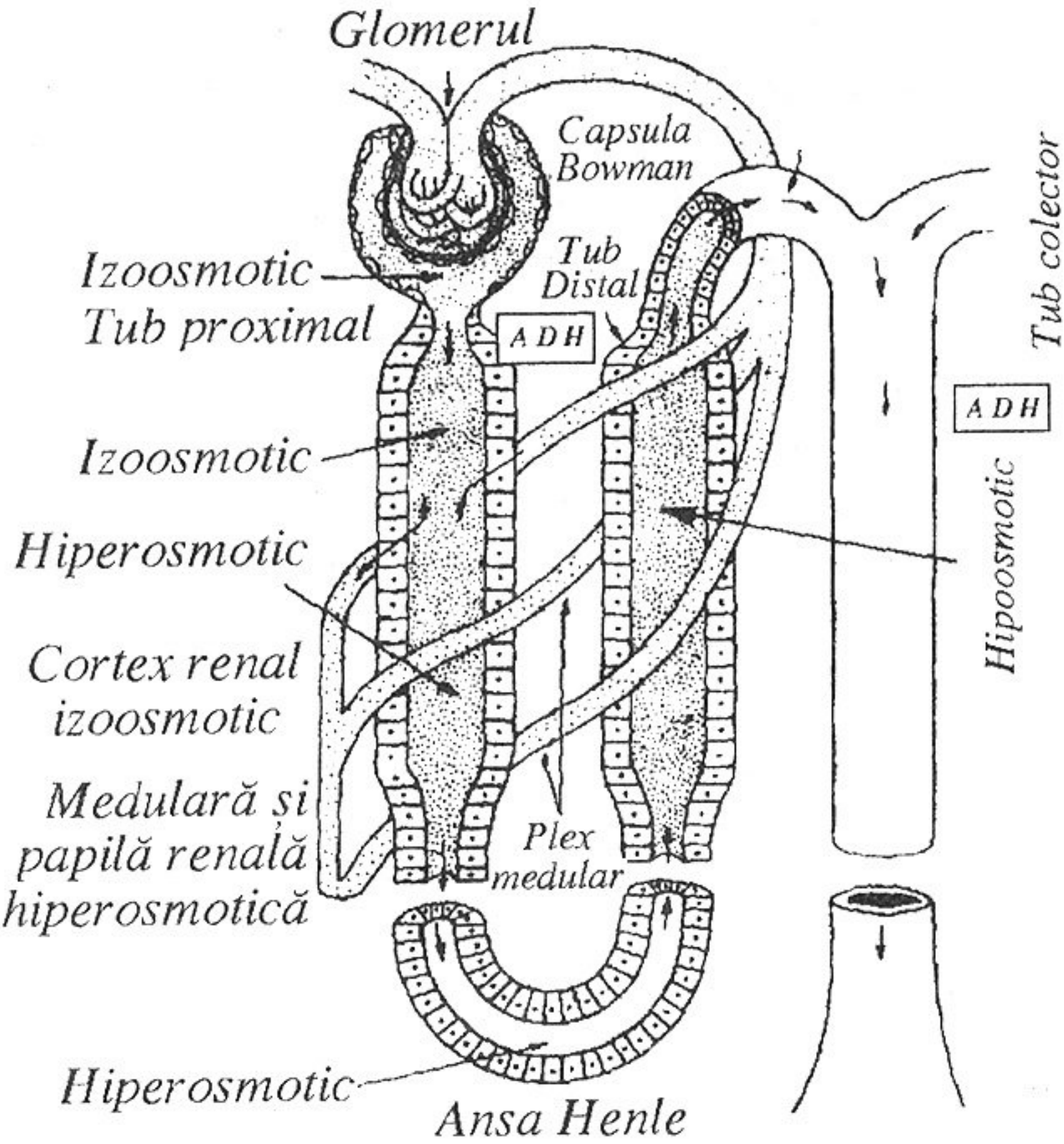


Fig.IV.1. **Reprezentarea schematică, anatomică și funcțională a nefronului**

IV.2.1.2. FILTRAREA GLOMERULARĂ

Filtratul glomerular este rezultatul proceselor fizice petrecute la nivelul glomerulilor în urma cărora se obține urina primară, care se deosebește de compoziția plasmei sanguine prin lipsa proteinelor și a lipidelor. Acest proces se datorează proprietăților morfofuncționale ale glomerulului și depinde de o serie de factori extrarenali, cât și de participarea unor mecanisme complexe de reglare în care participă mai mulți hormoni.

Din punct de vedere funcțional, capilarul glomerular se prezintă ca o membrană semipermeabilă care permite traversarea selectivă a moleculelor, în funcție de masa lor moleculară.

Dinamica filtrării glomerulare este condiționată de mai mulți factori care realizează separarea proteinelor din plasmă și apoi propulsează prin membrana filtrantă semipermeabilă faza lichidă rezultată.

Presiunea de filtrare - presiunea eficace de filtrare (pF) reprezintă acea presiune care forțează lichidele să traverseze membrana glomerulară și rezultă din interacțiunea conjugată a trei presiuni:

- presiunea capilară intraglomerulară (hidrostatică - ph);
- presiunea oncotică (po);
- presiunea din capsula Bowman (pc).

$$pF = ph - (po + pc) = 75 - (25 + 10) = 40 \text{ mm Hg}$$

Datorită oscilațiilor mari ale acestor parametrii se apreciază că presiunea eficace de filtrare are limite cuprinse între 20 - 40 mm Hg.

Ca urmare a filtrării se formează circa 120 - 140 ml urină primară / min (aproximativ 180 l / 24 ore), ceea ce face ca la un adult de 70 kg lichidul extracelular să fie filtrat de 15 - 16 ori în decurs de 24 ore.

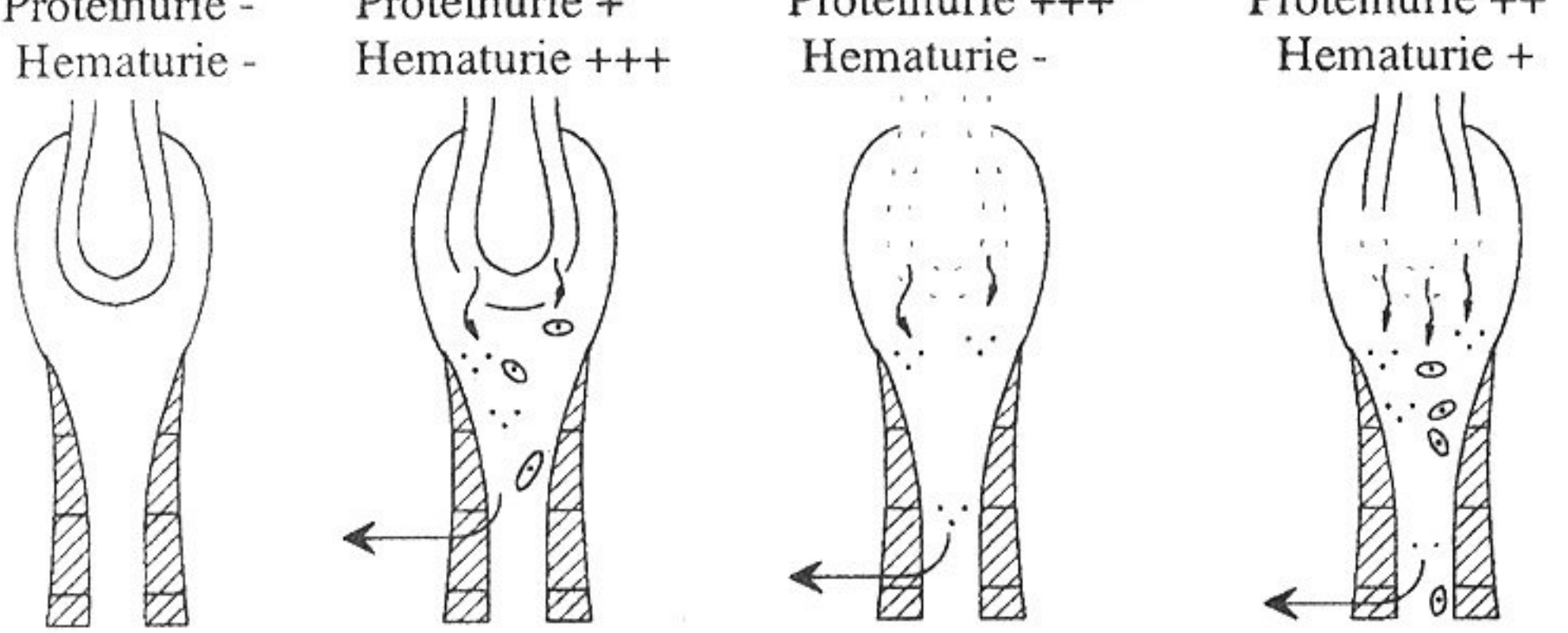


Fig.IV.2. **Mecanisme de producere a proteinuriei și hematuriei în boli glomerulare** (după Reubi).

Reglarea filtrării glomerulare se efectuează atât prin mecanisme extrarenale, cât mai ales prin mecanisme intrarenale (autoreglare), care-i conferă acestui organ o anumită independență hemodinamică.

Tulburarea filtrării glomerulare este consecința afectării factorilor care participă la acest proces și se traduce prin modificări în cantitatea și/sau calitatea urinei primare.

Membrana filtrantă glomerulară își modifică proprietățile morfologice în cursul diverselor stări patologice: nefrite, nefroze, boli alergice, toxice etc., astfel că membrana semipermeabilă selectivă devine permeabilă, fapt ce permite trecerea proteinelor serice (proteinurie) sau chiar a sângelui (hematurie). În figura IV.2. sunt prezentate schematic mecanismele existente în bolile glomerulare.

IV.2.1.3. REABSORBȚIA ȘI SECREȚIA TUBULARĂ

Ca urmare a proceselor de reabsorbție și secreție care au loc la nivelul tubului urinifer din cei 180 - 200 l urină primară formată în timp de 24 ore, rezultă 1 - 1,5 l urină definitivă.

În primul segment se reabsoarbe cea mai mare parte din filtratul glomerular: apa, ionii de Na^+, K^+ și Ca^{++}, glucoza, aminoacizii, ureea. Apa și substanțele solvite se reabsorb în proporții echivalente, iar lichidul tubular rămâne izoosmotic față de plasmă. La acest nivel are loc eliminarea unor substanțe străine introduse în organism, cum ar fi: PAH-ul, diodrastul, penicilina, BSP-ul etc.

Segmentele descendent și ascendent ale **„ansei lui Henle"** asigură procesul de concentrare a urinei prin procese osmotice și electrochimice ce au loc în cele mai multe cazuri cu consum de energie.

Tubul contort distal și tubul colector definitivează procesul de diluție și concentrare a urinei; aici se reabsoarb (facultativ) apa, sodiul, bicarbonații și are loc secreția H^+, K^+ și a amoniacului. Activitatea tubulară are la bază două tipuri de mecanisme:

- **activ** - efectuat prin intervenția unor complexe procese metabolice celulare;
- **pasiv** - cu eficiență mai redusă.

În funcție de comportarea față de aceste procese, componenții urinari se clasifică în două grupe: **cu prag** sau **fără prag** de eliminare.

Substanțele cu prag renal de eliminare sunt absorbite în totalitate la nivelul tubular, dar la un nivel plasmatic foarte ridicat peste **pragul renal**, surplusul este îndepărtat pe cale renală.

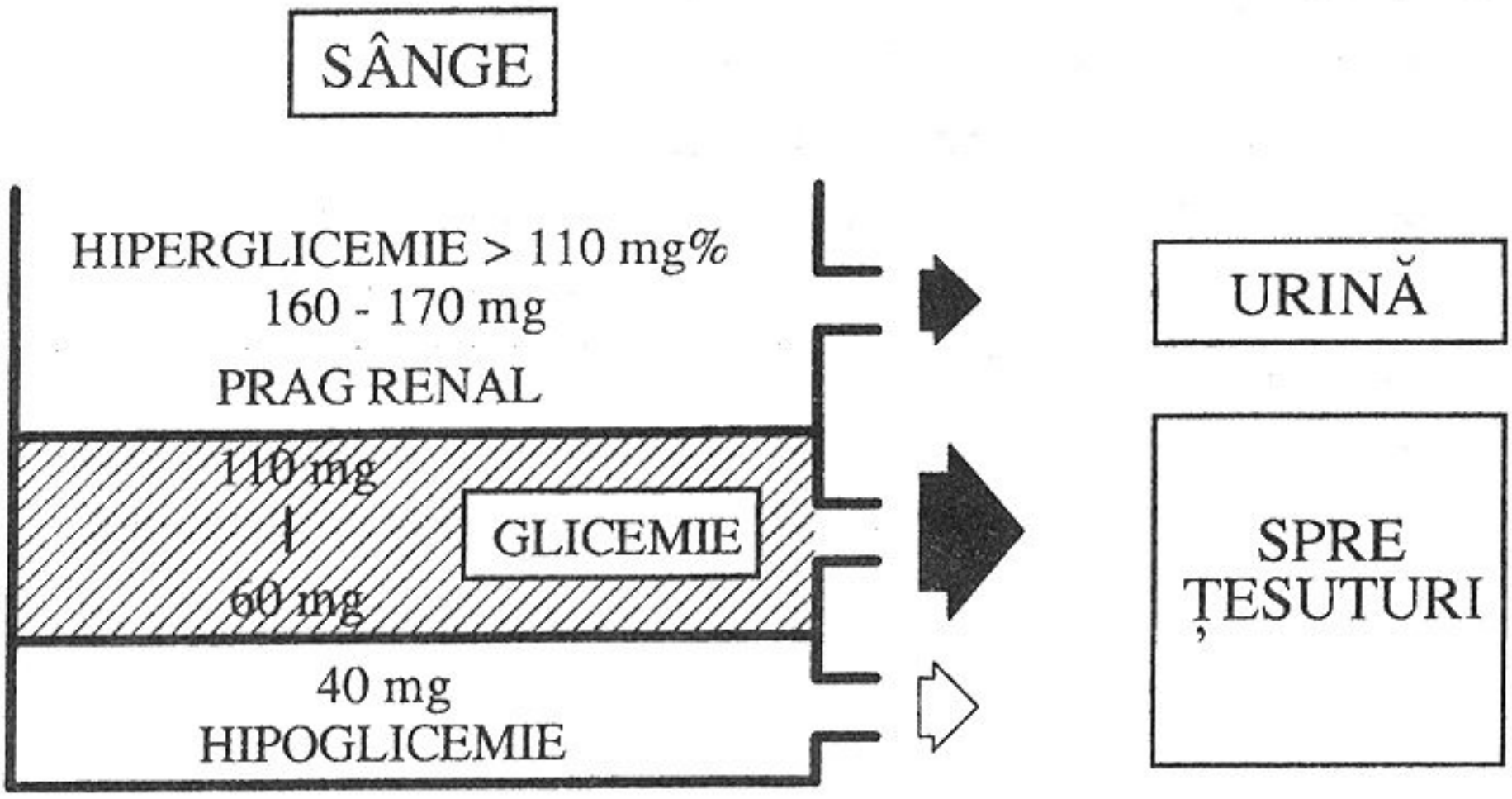


Fig.IV.3. **Ilustrarea plastică a pragului de eliminare.**

Atât timp cât concentrația lor în sânge este inferioară pragului de eliminare, ele nu se întâlnesc în urină sau se găsesc în concentrații minime. Atunci când acest prag este depășit, concentrația lor în urină crește rapid. Aceste substanțe sunt: glucoza, fosfații, calciul, aminoacizii, proteinele, acidul ascorbic și, într-o mai mică măsură, acidul uric care are un prag de eliminare foarte mic.

Substanțele fără prag renal de eliminare sunt absorbite la nivelul tubular numai într-o anumită proporție, indiferent de concentrația lor plasmatică, dar cantitatea reabsorbită crește odată cu ridicarea nivelului lor plasmatic deși clearance-ul lor nu se modifică. Aceste substanțe sunt reprezentate în special de produsele finale ale metabolismului (uree, creatinină), precum și o serie de compuși exogeni (Roșu de Congo, bromsulfonftaleină) care ajung în urină direct proporțional cu concentrația lor în sânge.

IV.2.2. COMPOZIȚIA URINEI

Constituienții urinari și limitele fiziologice de variație sunt prezentați în tabelul IV.5.

TABELUL IV.5. CONSTITUIENȚII URINARI ȘI LIMITELE DE VARIAȚIE A CONCENTRAȚIEI LOR.

Componente	Intervalul de variație a concentrației / 24 h	
I APĂ	1000 - 1500 g	
II REZIDUU TOTAL	50 - 75 g	
A. **Componente minerale:**		
◆ sodiu	2,75 - 5,06 g	120 - 280 mmol / d
◆ potasiu	0,98 - 3,91 g	25 - 100 mmol / d
◆ calciu	100 - 300 mg	2,5 - 7,5 mmol / d
◆ magneziu	50 - 150 mg	2,1 - 6,2 mmol / d
◆ clor	4,25 - 8,86 g	120 - 250 mmol / d
◆ fosfat	0,7 - 1,5 g	22,6 - 48,43 mmol / d
◆ sulfat	150 - 300 mg	4,7 - 9,4 mmol / l
B. **Componente bioorganice:**		
■ uree	13,2 - 36,6 g	202 - 609 mmol / d
■ acid uric	250 - 750 mg	1,48 - 4,46 mmol / d
■ aminoacizi liberi	1,05 - 2,4 g	7 - 16 mmol / l
■ amoniac	0,03 - 0,045 g	
■ corpi cetonici	- 5,0 mg	- 0,9 mmol / l
■ baze purinice	0,2 - 0,5	
■ acid hipuric	- 1500 mg	8,37 mmol / d
■ creatinină	B 8,7 - 24,6 mg/Kg corp / 24 h F 7,3 - 21,4 mg/Kg corp / 24 h	

Urina este un lichid biologic cu o compoziție variabilă, formată din apă, electroliți și substanțe bioorganice care rezultă prin metabolizarea compușilor celulari.

Compoziția urinei este strâns legată de compoziția sângelui și în consecință de starea metabolică a organismului.

Examenul clinic al urinei, sub aspect calitativ sau cantitativ, permite obținerea unor indicații utile privind starea întregului organism și pentru rezolvarea a numeroase aspecte patologice. Indicațiile

calitative sau cantitative pe care ni le oferă analiza urinei, alături de semne clinice și alte analize de laborator pot conduce la stabilirea unui diagnostic corect și la prescrierea unui tratament.

IV.2.3. RECOLTAREA ȘI CONSERVAREA URINEI

IV.2.3.1. RECOLTAREA URINEI

În general, determinările calitative și cantitative sunt efectuate pe volumul urinar colectat timp de 24 ore.

Recoltarea urinei se face după cum urmează: persoana căreia urmează să i se facă analizele este avertizată să înceapă această operație dimineața la o oră fixă (de exemplu, ora 8); emisia de la această oră se aruncă și tot ce urinează în cursul zilei și nopții se colectează în vase de sticlă acoperite, spălate cu soluție de carbonat de sodiu și apoi clătite bine cu apă distilată.

Prima emisie de a doua zi dimineața se colectează într-un vas separat, această ultimă recoltare fiind cea care va servi pentru **examenul sumar,** fiind urina care prezintă concentrația maximă.

Cantitatea de urină recoltată în cursul zilei, nopții și emisiunea de a doua zi dimineața reprezintă urina de 24 de ore.

La femei, înaintea recoltării se recomandă efectuarea toaletei vulvo-vaginale, recoltarea nefăcându-se în timpul perioadei menstruale pentru a se evita prezența hematiilor și a proteinelor.

Urina recoltată adusă la laborator e bine să fie însoțită de următoarele indicații de care trebuie să se țină în orice caz cont, indicații care, împreună cu rezultatele analizelor, vor contribui la stabilirea diagnosticului:

- vârsta, greutatea și sexul pacientului, natura regimului alimentar urmat;
- medicamentele luate sau, eventual, particularitățile tratamentului urmat;
- informații asupra activității sau stării de repaus;
- diagnosticul înregistrat anterior.

IV.2.3.2. CONSERVAREA URINEI

Pentru a se împiedica fermentarea rapidă a urinei, în special în anotimpul cald (când se poate produce o fermentație amoniacală) sau a infectării cu diferite microorganisme, este necesar ca urina să se păstreze la frigider. De asemenea se recomandă congelarea imediată a urinei (sub -20°C), fie folosirea unor substanțe conservante. Aceste substanțe trebuie să nu modifice compoziția chimică a urinei și trebuie să avem în vedere, că unele pot influența rezultatele, de exemplu cloroformul care împiedică studiul sedimentului urinar, iar formolul are proprietăți reducătoare falsificând rezultatul dozării glucozei.

TABELUL IV.6. PRINCIPALII CONSERVANȚI AI URINEI.

Conservanți	Cantitatea utilizată	Recomandat pentru dozarea
◆ acid clorhidric 10 n	50 ml	■ catecolamine
◆ carbonat de sodiu	5g	■ 17 - cetosteroizi
◆ cloroform	1 - 2 ml	■ porfirine
◆ fenol	1 - 2 ml	
◆ formol 40%	1 ml / 100 ml urină	■ sediment urinar
◆ timol	0,1 g / 100 ml	■ electroliți (Na^+, K^+, Ca^{2+})
◆ timol 10% în izopropanol	5 ml	■ aminoacizi, proteine, creatinină

În tabelul IV.6. sunt reprezentați cei mai importanți conservanți ai urinei împreună cu recomandările de utilizare pentru fiecare caz în parte.

Este de dorit însă, ca efectuarea analizelor să se facă în cel mult 2 - 3 ore de la ultima recoltare, evitându-se astfel toate inconvenientele amintite mai sus.

IV.2.4. CARACTERISTICILE FIZICO - CHIMICE ALE URINEI

Urina prezintă o serie de caracteristici fizico - chimice atât sub raport analitic, cât și clinic, a căror cunoaștere este foarte importantă pentru interpretarea corectă a unei analize.

IV.2.4.1. ASPECTUL GENERAL

O urină normală se prezintă imediat după emisie limpede și transparentă. Lăsată în repaus câteva ore, apare un depozit floconos, denumit „**nubeculum urinae**", care este format din celule de descuamație a căilor urinare sau din celule vaginale la femei. Pentru precizarea naturii unui aspect tulbure al urinei se procedează în felul următor:

- într-o eprubetă se introduc aproximativ 5 - 6 ml urină și se încălzește la flacără; dacă tulbureala dispare, înseamnă că aceasta s-a datorat uraților și oxalaților;
- în altă eprubetă se introduc, tot 5 - 6 ml urină peste care se pipetează 1 ml de acid acetic 10%; dispariția tulburelii indică prezența unui depozit de fosfați și carbonați;
- tulbureala provocată de prezența puroiului, întâlnită în pielite și cistite cronice, nu dispare la adaus de acizi sau baze, ci se produce o precipitare a acestuia (reacția Donée).

În glomerulonefrita acută, urina are un aspect de „**bulion de carne**", lăsând după câteva ore un depozit variabil ca volum, compus din sânge, cilindri hialini, granuloși și leucocite.

În leziunile cronice renale, ca și în diabetul insipid, întâlnim urină limpede ca apa, transparentă și fără sedimente.

În tuberculoza renală se poate observa o pierdere a luciului caracteristic al urinei.

Aspectul urinei poate fi apreciat deci ca: limpede, ușor opalescent, tulbure, elemente de suspensie, depozit (a se nota natura). Analiza unei probe de urină tulbure (cu excepția determinării acidității) se execută numai după centrifugarea acesteia.

IV.2.4.2. CULOAREA

Urina normală are o culoare de un galben deschis până la galben roșcat, datorită prezenței unor pigmenți ca: urocromi, urobilina,

porfirinele, derivați ai indoxilului urinar. În forma lor redusă, pigmenții sunt incolori, culoarea urinei depinzând de gradul de oxidare al acestora.

Culoarea urinei este influențată de ora emisiunii, prima de dimineață fiind cea mai concentrată (deci cu o densitate mai mare) și având o nuanță mai închisă, în timp ce emisiunile ulterioare sunt mai decolorate și cu densitate mai mică.

TABELUL IV.7. CULOAREA URINEI ÎN INGESTIA DE MEDICAMENTE ȘI ÎN DIVERSE STĂRI PATOLOGICE.

Medicament	Culoare	Stare patologică	Culoare
• diuretice	galbenă foarte clară	■ diabet insipid	galbenă clară, aproape incoloră
• sulfamide	galbenă portocalie	■ diabet zaharat	galbenă clară, aproape incoloră
• antipirină	galbenă portocalie	■ insuficiență renală	galbenă clară, aproape incoloră
• piramidon	galbenă portocalie	■ scleroză renală	galbenă palidă
		■ boli febrile, acute	galbenă portocalie
• santonină	portocalie	■ porfirinurie	roșie
• aspirină	roșie	■ hemoglobinurie	roșie
• fenolftaleină	roșie purpurie	■ hematurie	roșie
• roșu de fenol	roșie purpurie	■ methemoglobinurii	cenușie
• albastru de metilen	albastră verzuie	■ nefrite acute	verde roșiatică
• salol	brună neagră	■ afecțiuni hepatice	brună roșcată
• fenol	brună neagră	■ sindrom icteric	brună
• pirogalol	brună neagră	■ alcaptonurie	neagră
• naftalină	brună neagră		
• tanin	brună neagră		
• acid salicilic	brună neagră		

Culoarea este influențată, de asemenea de pH-ul urinar, urina mai acidă fiind mai închisă, iar cea alcalină mai deschisă, ambele putând avea însă aceeași densitate.

Urina este mai închisă la culoare după eforturi fizice, alimentație hiperproteică, stări febrile, datorită concentrării ei, oliguriei și mai palidă în poliurii, indiferent de natura lor.

După ingerarea unor medicamente sau în diverse stări patologice, pot apărea anumite modificări de culoare față de starea normală (vezi tabelul IV.7.).

Urina poate avea deci următoarele culori: galben pal, galben clar, galben, galben roșcat, roșu galben, roșu albastru, brun, negru brun.

IV.2.4.3. MIROSUL

În mod normal, urina are un miros fad caracteristic, amintind puțin de mirosul de migdale amare, care se datorește **acizilor volatili** sau substanțelor numite „**urinoide**".

Urina concentrată prezintă un miros mai accentuat. Ingerarea unor medicamente sau a unor anumite alimente imprimă urinei mirosuri caracteristice (vezi tabelul IV.8.).

TABELUL IV.8. CARACTERISTICI ODORANTE ALE URINEI.

Cauza fiziologică sau patologică	Miros
◆ ingestia unor cantități de sparanghel, usturoi, hrean	◆ dezagreabil
◆ administrarea de medicamente cu esență de terebentină	◆ parfum de violete
◆ boli infecțioase sau tumorale renale și ale căilor excretoare renale, pielonefrite	◆ amoniacal
◆ infecții cu floră anaerobă	◆ putrid
◆ diabet zaharat, vărsături acetonemice ale copiilor	◆ mere acre
◆ eliminarea în urină a unor aminoacizi: leucină, izoleucină, valină	◆ sirop de arțar
◆ eliminarea în urină de fenilalanină, tirozină, metionină	◆ de hamei
◆ eliminarea în urină de acid valerianic	◆ de brânză
◆ cistite	◆ fetid

IV.2.4.4. CONSISTENȚA

Urina normală are consistența unei soluții slab saline. Urina care conține albumină prezintă o **spumă persistentă**, cea cu puroi este **filantă**, iar aceea cu o concentrație mare de glucide sau unii aminoacizi, **siropoasă**.

IV.2.4.5. VOLUMUL URINEI

Cantitatea de urină excretată în 24 de ore (diureza) de un individ sănătos este influențată de următorii factori fiziologici:

- alimentația, cantitatea de lichid ingerată;
- temperatura și umiditatea mediului înconjurător;
- poziția corpului, durata și intensitatea muncii;
- exercițiul fizic, stările de excitație psihice;
- greutatea, vârsta și sexul.

În mod normal, un bărbat de 70 kg, în repaus sau cu o muncă moderată, la un regim hidric echilibrat și locuind într-o climă temperată, elimină în 24 de ore 1200 - 1800 ml urină, iar o femeie, în aceleași condiții, elimină 1000 - 1400 ml.

Volumul de urină eliminat în cursul nopții și cel eliminat în timpul zilei se găsește într-un anumit raport numit „**raport nictmeral**" a cărui valoare normală este în medie de 1/3,5.

TABELUL IV.9. MODIFICĂRI PATOLOGICE ALE DIUREZEI.

Denumirea	Caracterizare
A. Modificarea volumului urinar eliminat în 24 de ore.	
◆ Oliguria	► scăderea diurezei sub 1000 ml / 24 h
◆ Poliuria	► creșterea diurezei peste 2000 ml / 24 h
◆ Anuria	► scăderea diurezei sub 250 ml / 24 h
B. **Modificarea ritmului eliminării în 24 de ore.**	
◆ Polakiuria	► eliminarea frecventă a urinei în cantități reduse
◆ Disuria	► jena la micțiune, însoțită sau nu de dureri
◆ Nicturia	► eliminarea unei cantități mai mari de urină în cursul nopții
◆ Opsiuria	► demaraj întârziat în eliminarea urinei, după o ingestie mai mare de lichide
◆ Retenția acută sau anuria de tip excretor	► o suprimare mecanică obstructivă a eliminării urinei, datorită comprimării uretrei (prostată, neoplasm)

Modificările patologice ale diurezei se referă la:

- modificarea volumului urinar în 24 de ore și
- modificarea ritmului eliminării în 24 de ore și sunt prezentate în tabelul IV.9.

Din categoria acestor modificări cele mai frecvente și mai importante sunt poliuriile și oliguriile.

A. **Poliuriile** se manifestă prin creșterea volumului urinar peste nivelul de 2000 ml în 24 de ore și pot fi fiziologice sau patologice (vezi tabelul IV.10.).

Poliuriile fiziologice sunt întâlnite la persoane sănătoase care ingeră cantități mari de lichide sau alimente vegetale bogate în apă (fructe și legume). La echilibrarea regimului alimentar, precum și la restrângerea consumului de lichide, diureza revine la normal. În cazul poliuriilor fiziologice raportul nictmeral rămâne normal și, în acest fel, se pot deosebi de poliuriile patologice.

TABELUL IV.10. **POLIURII.**

Fiziologice	**Patologice**	
	Renale	**Extrarenale**
◆ frig, umezeală, emoții ◆ consum excesiv de cafea, lichide, băuturi slab alcoolice (în special berea)	■ glomerulonefrita cronică ■ pielite, pielonefrite ■ scleroză renală primară sau secundară ■ tuberculoza renală ■ hipertrofie de prostată ■ amiloidoza renală ■ rinichi polichistic	• boli infecțioase • diabet zaharat • diabet insipid • malnutriție • administrarea de diuretice • edeme de natură cardiacă, hepatică, renală • hipertiroidie • după crize de epilepsie

Poliuriile renale sunt cauzate de faptul că rinichiul își pierde capacitatea de concentrare și își compensează deficitul funcțional printr-o creștere a diurezei. Caracteristic poliuriilor de natură renală este nicturia și scăderea greutății specifice a urinei.

B. **Oliguriile** reprezintă scăderea volumului urinar sub 1000 ml în 24 de ore și pot fi și ele fiziologice sau patologice (vezi tabelul IV.11.).

Oliguriile fiziologice dispar după o echilibrare a aportului hidric. Oliguriile renale sunt datorate alterării celor două componente anatomice și funcționale ale nefronului: glomerulul și tubul contort.

C. **Anuria**. În unele cazuri foarte rare înregistrăm încetarea completă a excreției urinare (se elimină totuși o cantitate mai mică de 250 ml urină în 24 de ore). Anuria apare în toate afecțiunile în care se produce oligurie, dacă acțiunea factorilor cauzali este mai intensă sau de durată mai lungă.

TABELUL IV.11. OLIGURII.

Fiziologice	**Patologice**	
	Renale	**Extrarenale**
◆ ingestia de cantități mici de lichide ◆ pierderea excesivă de apă prin transpirație ◆ consum de alimente cu un conținut mic în apă	■ glomerulonefrite difuze ■ glomerulonefrite cronice ■ nefrite interstițiale ■ nefropatii tubulare toxice ■ litiază renală ■ tumori ale micului bazin ■ cuduri ureterale prin rinichi mobil	• stări de deshidratare (diaree, hemoragii, vărsături) • tulburări nervoase reflexe • afecțiuni hepatice • stări febrile • insuficiență cardiacă • hipotiroidism, șoc

De menționat că anuria apare:

■ prin **mecanism reflex** după deschiderea peritoneului, extracții dentare, sugestie hipnotică;

■ prin **acțiuni nefrotoxice** directe, după seroterapie, vaccinoterapie, transfuzii incompatibile, alergie alimentară sau microbiană.

Stabilirea volumului de urină de 24 de ore se face cu un cilindru gradat sau pahar conic gradat. Volumul urinar are, pe lângă

valoarea lui clinică și o dublă valoare analitică, concretizată de faptul că, pe de o parte rezultatele analitice se raportează la volumul emis în 24 de ore, iar pe de altă parte, în special în urina patologică, anumiți compuși, cum ar fi glucoza, se elimină într-un ritm variabil, în raport cu orele zilei.

IV.2.4.6. DENSITATEA

Urina normală este o soluție cu o concentrație cuprinsă între 50 - 70 g reziduu sec/l, așa că densitatea va fi mai mare decât aceea a apei, fiind cuprinsă între limitele 1,001 - 1,035. Urina de dimineață, fiind mai concentrată, are o densitate mai mare decât cea din cursul zilei. Densitatea sau greutatea specifică depinde de substanțele dizolvate și anume: diverse săruri și ureea la indivizii sănătoși, glucoza și albumina în unele cazuri patologice. Densitatea urinară variază în funcție de aportul alimentar și de cantitatea de lichide ingerate, fiind în același timp diferită la același individ în cursul aceleiași zile, motiv pentru care se stabilește în mod curent, pe urină de 24 de ore.

Densitatea reprezintă concentrația substanțelor urinei și aceasta se poate aprecia - cu aproximație - prin înmulțirea ultimelor cifre ale densității cu 2,6 (coeficientul lui Long), obținându-se concentrația în substanță uscată exprimate în grame la litru. De exemplu, o urină cu densitatea 1,025 la temperatura de 25°C va cuprinde 25 x 2,6 = 65 g substanță uscată/l. Densitatea este de obicei invers proporțională cu intensitatea culorii. Urina patologică ce conține pigmenți intens colorați fac excepție de la această regulă. Densitatea urinară este bine corelată și cu osmolaritatea urinei determinată cu ajutorul punctului crioscopic sau al rezistivității electrice a urinii.

Abaterile patologice ale densității urinare sunt următoarele:

- **hipostenuria** este caracterizată prin elaborarea unei urini cu o concentrație mai mică decât a plasmei (300 mosm), așa cum se întâlnește în hiperhidratări, diabet insipid, insuficiență renală acută, insuficiență renală cronică (faza compensată);

◆ **izostenuria** caracterizată printr-o urină a cărei concentrație este egală cu osmolaritatea plasmei, întâlnită în insuficiență renală;

◆ **hiperstenuria** caracterizată prin elaborarea unei urini cu densitate mai mare de 1,035, întâlnită în stări de deshidratare, diabet zaharat cu glicozurie mare, după administrarea unor substanțe de contrast etc.

IV.2.4.7. PH-ul URINAR

În mod normal, urina de 24 de ore a persoanelor care au un regim alimentar mixt prezintă un pH mediu în jur de 6. Limitele fiziologice ale acestui parametru sunt cuprinse între **5,2** și **8,4** fiind dependente, în primul rând, de regimul alimentar. În cazul unui regim alimentar strict carnat, urina este mai acidă, pH 5,2 - 5,3; în cazul unui regim strict vegetarian sau când se ingeră bicarbonat de sodiu sau ape minerale alcaline, urina este alcalină, pH 7,0 - 7,5.

Diferite stări patologice pot influența pH-ul urinar:

► **urină alcalină** întâlnim în timpul reabsorbției edemelor, după vărsături abundente, în infecția căilor urinare cu anumite specii de germeni, pielonefrite, cistite;

► **urină acidă** întâlnim în următoarele cazuri: în diabetul zaharat decompensat în care există o eliminare bogată de corpi cetonici, în cazurile de insuficiență renală gravă, datorită faptului că rinichiul nu mai este capabil să sintetizeze amoniac, în reumatism, nevroză, maladii febrile.

IV.2.5. ANALIZA FIZICO - CHIMICĂ A URINEI

În cele ce urmează sunt prezentate principalele aspecte analitice referitoare la urina normală, atât din punct de vedere metodic cât și al interpretării clinice.

IV.2.5.1. DETERMINAREA DENSITĂȚII URINARE

Densitatea urinei se determină frecvent cu ajutorul urodensimetrului **Niemann** care este confecționat din sticlă și este format din trei părți distincte:

- o parte inferioară în formă de pară, plină cu mercur sau cu alice de plumb;
- o parte mijlocie prevăzută cu un termometru;
- o tijă superioară gradată între 1,000 - 1,060 pe care se citește densitatea.

Urodensimetrul Niemann este ambalat și păstrat într-un suport special de carton.

Tehnica de lucru.

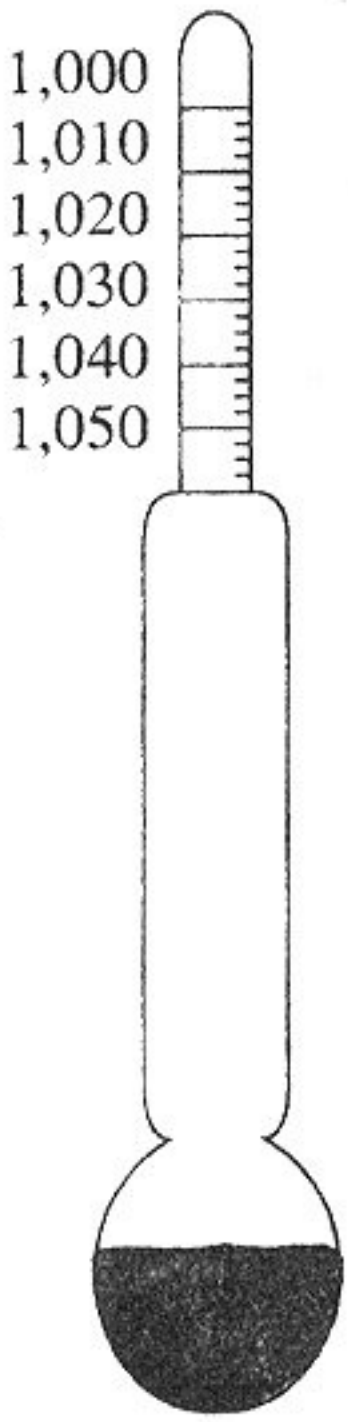


Fig.IV.4. **Urodensimetrul Niemann.**

➢ urina de 24 de ore se introduce într-un cilindru gradat de 100 cm^3 și se agită cu atenție pentru a nu se forma spumă;

➢ dacă, totuși, aceasta se formează, va fi îndepărtată cu ajutorul unei hârtii de filtru;

➢ se introduce urodensimetrul în cilindru, lăsându-l să plutească liber și având grijă să nu fie lipit de pereții cilindrului;

➢ după ce s-a stabilizat, se citește pe tija gradată a urodensimetrului densitatea urinei;

➢ în cazul în care temperatura citită pe termometrul densimetrului este alta decât aceea la care a fost etalonat urodensimetrul, se efectuează o corecție de temperatură și anume se adaugă sau se scade la densitatea citită 0,001 pentru fiecare trei grade plus sau minus peste această temperatură;

➢ în cazul în care urina conține albumină în proporție de 2 - 3 g / 1000 ml, se face o dezalbuminare prin fierbere și apoi se readuce volumul la valoarea sa inițială cu apă distilată;

➢ atunci când cantitatea de albumină este mai mare de 7 g / 1000 ml se scade din densitatea citită 0,26 pentru fiecare gram de albumină.

IV.2.5.2. DOZAREA ACIDITĂȚII TOTALE URINARE.

METODA MALY - DËNIGES

Principiul metodei. Fosfații și carbonații urinari sunt precipitați cu o soluție de clorură de bariu sub formă de săruri neutre, se filtrează, iar filtratul se titrează cu o soluție de normalitate cunoscută de hidroxid de sodiu, în prezența fenoftaleinei ca indicator.

Reactivi: NaOH 0,1 n; $BaCl_2$ 10%; H_2SO_4 0,1 n; soluție alcoolică de fenoftaleină 1%.

Tehnica de lucru.

- se măsoară 20 ml urină, 20 ml NaOH 0,1 n și 10 ml $BaCl_2$ 10% și se introduc într-un balon cotat de 100 cm^3;
- se agită și se completează cu apă distilată până la cotă, iar după 5 minute se filtrează;
- din filtratul limpede se măsoară într-un balon Erlenmeyer 50 ml (echivalent cu 10 ml urină);
- se adaugă 10 ml H_2SO_4 0,1 n pentru neutralizarea NaOH introdus inițial și câteva picături din soluția de fenoftaleină;
- se titrează conținutul balonului cu NaOH 0,1 n până la apariția unei colorații roz persistente.

Calcul. Aciditatea totală se poate exprima în mod convențional în g H_2SO_4 sau în g HCl.

Fie n numărul de ml de NaOH n/10 folosiți la titrare:

n x 0,0049 x 100 = g H_2SO_4/1000 ml urină;

n x 0,00365 x 100 = g HCl/1000 ml urină.

Valorile fiziologice normale sunt: **2,00 - 2,40 g H_2SO_4/24 ore;**

1,50 - 1,80 g HCl/24 ore.

și variază în funcție de regimul alimentar, crescând în efortul muscular.

IV.2.6. EXAMENUL SUMAR DE URINĂ

De foarte multe ori, pentru precizarea diagnosticului, este necesar **examenul sumar de urină** care constă dintr-o serie de probe calitative ce pot fi încadrate în următoarele trei categorii:

► caracteristici fizico - chimice generale (aspect, culoare, pH, densitate, volum);

► identificarea componentelor patologice care în mod normal nu se găsesc în urină sau se găsesc în cantități extrem de mici (albumină, glucoză, acetonă, urobilinogen, urobilină, săruri biliare);

► analiza sedimentului urinar.

IV.2.6.1. SEDIMENTUL URINAR

Cercetarea histopatologică a sedimentului urinar relevă:

• **starea histopatologică a nefronului** și **căilor urinare** de excreție;

• eliminarea unor elemente patologice și a unui exces de elemente celulare, normal întâlnite în urină, traduce în fapt leziunea acestor formațiuni **anatomo - funcționale.**

• **Prepararea sedimentului.** Se va proceda după cum urmează:

◆ după o agitare energică, urina proaspăt recoltată se transvasează într-un pahar conic;

◆ în paharul conic trebuie lăsată timp de 1 - 2 ore, unde se depune un sediment variabil ca volum și care este pipetat într-o eprubetă de centrifugă;

◆ se centrifughează timp de 5 - 6 minute la o viteză de 1500 - 1800 turații/minut;

◆ pentru recoltarea sedimentului se folosește o pipetă cu vârful efilat pentru a se obține picături mici, care se trec pe o lamă bine degresată și curată;

◆ pentru examenul microscopic se folosesc obiectivele 3 și 7 și ocular 10.

În urina normală și patologică apar sedimente care pot fi clasificate în două grupe mari:

I. Sedimente **neorganizate** constituite din diferiți compuși organici și minerali;

II. Sedimente **organizate** formate, în general, din elemente celulare și cilindri urinari.

IV.2.6.2. SEDIMENTUL NEORGANIZAT

Pentru cercetarea sedimentului neorganizat este necesar să se cunoască pH-ul urinei, deoarece, în funcție de acesta, în urină precipită un anumit tip de cristale. Din această cauză, tipuri speciale de sedimente neorganizate pot fi întâlnite în:

- urina acidă; ■ urina alcalină;
- ◆ urină patologică;
- ► urină conținând cristale de sulfamidă.

IV.2.6.2.1. SEDIMENTUL URINEI ACIDE

► **acidul uric** ce prezintă cristale de forme variate: lamele romboidale, prisme cu 6 fețe sau rozete. Prezintă o culoare galben - brună, este puțin solubil și se menține în soluția urinară datorită prezenței coloizilor de protecție. O creștere cantitativă a acidului uric se înregistrează în stările în care se degradează o cantitate mare de nucleoproteine, ca de altfel în insuficiența renală gravă, când rinichiul își pierde capacitatea de neutralizare a elementelor acide.

► **uratul de sodiu și potasiu** se prezintă sub formă de depozite amorfe de culoare roșie - cărămizie. În unele cazuri de gută, acidul uric și urații precipită nu numai în urină, dar chiar și în unele țesuturi.

► **oxalatul de calciu** prezintă cristale sub formă de octaedri pătrați, puternic refringenți. Apariția cristalelor în urina proaspăt emisă poate să presupună existența unui calcul renal. Cu toate acestea apar cristale de oxalat de calciu și la indivizii sănătoși, după ingestia unor

alimente bogate în această substanță: afine, mere, portocale, struguri, măcriș, pătlăgele roșii, sfeclă, spanac.

► **fosfat secundar de calciu** care se prezintă sub forma unor cristale prismatice triunghiulare reunite în stea sau sub forma unor mici ace izolate sau unite în cruce. Se întâlnesc în urina slab acidă și chiar la începutul fermentației amoniacale.

► **sulfatul de calciu** se prezintă sub formă de ace incolore, tablete prismatice alungite sau sub formă de rozete. Se întâlnește de obicei la bolnavii care urmează o cură de ape sulfuroase.

► **acidul hipuric** are forma unor cristale prismatice romboidale și incolore. Se întâlnește în urină după ingestia de acid benzoic și salicilic, precum și după ingestia unor fructe bogate în acest compus: afine negre și afine roșii.

IV.2.6.2.2. SEDIMENTUL URINEI ALCALINE

▪ **fosfați amorfi (de calciu și magneziu**) care au aspectul unor grăunțe mărunte și incolore sau al unor sfere mici. Precipitarea fosfaților în urină poate fi determinată de un regim alimentar bogat în vegetale.

▪ **fosfatul amoniacomagnezian** se prezintă sub forma unor prisme incolore, triunghiulare, pătrate sau hexagonale, asemănătoare cu niște capace de coșciug. Se întâlnesc în urina veche sau prost conservată datorită unor fermentații amoniacale bacteriene.

▪ **uratul de amoniu** are forma unor sfere galben - brune, intens colorate. Se întâlnește în special, în urina copiilor.

▪ **carbonatul de calciu** se prezintă sub forma unor sfere mici legate între ele sau sub formă de mici grămăjoare alcătuite din 5 - 6 cristale. La adausul de acid clorhidric se produce o dizolvare rapidă a cristalelor cu eliminarea de bule de gaz (CO_2).

IV.2.6.2.3. SEDIMENTE MAI RAR ÎNTÂLNITE ÎN URINA PATOLOGICĂ

• **cistina** are forma unor mici plăci transparente cu 6 fețe incolore; apare în **cistinurie**.

• **leucina și tirozina.** Leucina se prezintă sub formă de sfere mici și strălucitoare, cu dungi radiare și concentrice. Cristalele de tirozină au forma unor ace foarte subțiri, adunate în mănunchiuri. Se întâlnesc în leziuni grave hepatice, în boli infecțioase, în scarlatină și în vărsăturile incoercibile ale gravidelor.

• **grăsimi și cristale de acizi grași** ce se prezintă sub forma unor sfere de dimensiuni variabile, puternic refringente. Se întâlnesc în special, în așa numita **chilurie trofică** și chilurie europeană. Apar, de asemenea, în bolile renale degenerative (nefroze), unele (formațiuni) cu aspectul „**crucii de Malta**", înconjurată de un halou fin.

• **colesterolul** are forma unor plăci romboidale subțiri și apare în degenerescența grasă a rinichiului.

IV.2.6.2.4. SEDIMENTE CONȚINÂND CRISTALE DE SULFAMIDE

Sulfamidele prezintă cristale de forme geometrice asemănătoare cu acelea prezentate și de alte substanțe chimice ce se pot elimina prin urină atât în stare normală, cât și patologică. De aceea, pentru a înlătura orice greșeală de interpretare a unui sediment urinar, este absolut necesară cunoașterea cristalelor sulfamidice care apar în urină după administrarea acestora pe cale orală.

Cele mai des întâlnite sunt:

► **sulfamida** care are forma unor cristale lungi și transparente, cu tendință de aglomerare;

► **sulfatiazolul** care se prezintă sub forma unor cristale cu aspectul unor căpițe de grâu legate și compuse din două semicercuri;

► **sulfapiridina** prezintă cristale cu aspectul uneltei de ascuțit coasa;

► **sulfadiazina** are forma unor sfere verzi, închise la culoare, cu marginile pufoase sau netede.

IV.2.6.3. SEDIMENTUL ORGANIZAT

Sedimentul organizat este insolubil la cald în acid acetic și acid clorhidric, deosebindu-se prin aceasta de sedimentul neorganizat. Acest sediment are o densitate mică, din care cauză precipită cu mult mai lent. În cadrul sedimentelor organizate se întâlnesc următoarele grupe de elemente:

- elemente celulare; ■ cilindri adevărați;
- pseudocilindri; ■ alte diferite elemente.

IV.2.6.3.1. ELEMENTELE CELULARE

◆ **celulele epiteliale** care provin din descuamarea epiteliului tractusului urogenital. În stările patologice, aceste celule apar în cantitate mare în urină, când pot fi însoțite de albuminurie, de puroi sau de filamente de mucus.

◆ **leucocitele** se întâlnesc în urină sub aspectul unor mici sfere granuloase, având de obicei o formă rotundă, regulată. Pot fi însoțite de puroi și albuminurie. Un număr mare de leucocite se întâlnește în toate procesele supurative ale căilor urinare.

◆ **hematiile** care se întâlnesc în urină au aspectul unor discuri regulate, colorate în galben verzui și lipsite de nucleu. Studiul lor dă indicații prețioase pentru diagnosticarea unor boli. Întâlnim slabe hematurii în: neoplasmul urinar, procese inflamatorii, tuberculoza renală, inflamații prostatice sau, la femei, după menstruație. Hematurii intense apar într-o serie de procese patologice ale aparatului urinar, cum ar fi hemoragiile de origine renală, bazinetală sau ureterală, precum și în calculoza aparatului urinar.

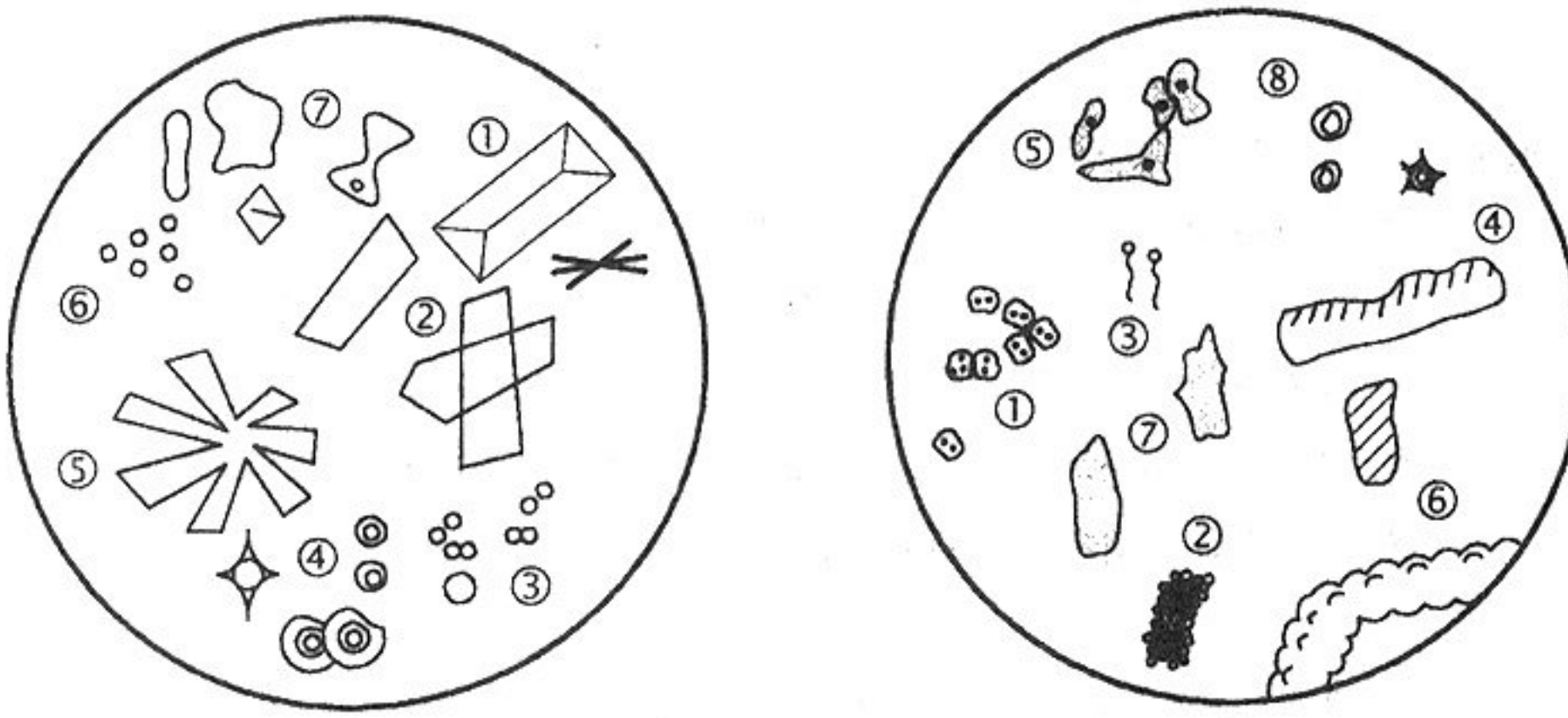
IV.2.6.3.2. CILINDRII URINARI. ALTE ELEMENTE

Sunt formațiuni lunguiețe, având o formă cilindrică specială. Aceștia se întâlnesc de cele mai multe ori în urina care conține albumină și mai rar în cea fără albumină. Din categoria cilindrilor urinari fac

parte: cilindrii hialini, cilindrii granuloși, cilindrii hematici, cilindrii epiteliali, cilindrii ciroși, cilindroizii etc. Numărul, forma și valoarea lor de diagnostic sunt foarte variate și se întâlnesc în special în diferite afecțiuni renale, mai ales în nefrite.

Alte elemente apar mai rar. Din această categorie fac parte filamente de mucus, spermatozoizii și elementele neoplazice care apar în unele afecțiuni ale aparatului urogenital.

În cele ce urmează, sunt prezentate câteva profiluri ale diferitelor formațiuni existente în sedimentul urinar.



A B

Fig.IV.5. **Sedimente prezente în urină.**

A. **Sedimente neorganizate.**

1. Fosfați de amoniu și magneziu
2. Fosfați bismagnezieni;
3. Carbonat de calciu;
4. Urat de amoniu;
5. Fosfat de calciu;
6. Fosfați alcalino-teroși;
7. Oxalat de calciu.

B. Sedimente organizate.

1. Hematii;
2. Cilindri leucocitari;
3. Celule epiteliale;
4. Cilindri hialini;
5. Spermatozoizi;
6. Cilindri grăsoși;
7. Cilindri granuloși.

IV.2.7. CALCULII URINARI

Calculii urinari sunt concrețiuni de forma unor pietricele care se elimină prin urină. Existența lor este datorată precipitării împreună, în

anumite condiții, a unor substanțe bioorganice și anorganice frecvent întâlnite în sedimentul urinar.

Calculii urinari pot fi secundari sau primari, potrivit felului în care iau naștere - depinzând de o cauză locală sau rezultând dintr-o modificare a echilibrului umoral; în conformitate cu compoziția lor, pot fi simpli sau micști. Aceste constatări se pot confirma prin analiza lor, care se execută după ce au fost spălați cu apă distilată și uscați la etuvă la 110ºC. Se disting următoarele tipuri principale de calculi:

- **calculi de acid uric**, calculi denși, globoidari, mamelonați, duri, de culoare roșcată;
- **calculi de urați alcalini**, calculi colorați în galben deschis, cu aspect pământos, moi;
- **calculi fosfatici**, calculi cu aspect pământos, formați din fosfați amoniaco - magnezieni; ce pot avea un sâmbure uric;
- **calculi oxalici**, muriformi, bruni sau verzi;
- **calculi cistici**, ușori, moi, galbeni, translucizi, ceroși;
- **calculi pigmentari** care se întâlnesc foarte rar.

IV.2.7.1. EXAMENUL FIZICO-CHIMIC AL UNUI CALCUL

1. **Fizic.** Se notează următoarele caracteristici: greutate, densitate, aspect, culoare, duritate, structură (amorfă, cristalină), natură omogenă (prezența unui miez); eventual se face desenul.

2. **Analiza calitativă rapidă.**

Materiale și reactivi.

1. Acid azotic concentrat;
2. Acetat de sodiu, soluție 25%;
3. Capsulă de porțelan;
4. Fosfat de sodiu, soluție 10%;
5. Hidroxid de sodiu, soluție 20%;
6. Hipoclorit de sodiu;
7. Iodură de potasiu, soluție 10%;
8. Oxalat de amoniu, soluție 4%;
9. Reactiv molibdenic: 15 g molibdat de amoniu se dizolvă în 100 ml apă distilată, apoi se adaugă 100 ml HNO_3 concentrat.

I. **Calculi galbeni ocru** sau roșcați, denși, mamelonați.

► într-o capsulă de porțelan se introduce un fragment din calcul cât un vârf de ac;

► se adaugă două picături de acid azotic concentrat și se evaporă amestecul pe flacără slabă;

► reziduul roșu devine albastru violet prin adăugarea de hidroxid de sodiu 20% (reacția murexidului), ceea ce atestă prezența acidului uric sau uraților.

II. **Calculi albi teroși omogeni** (fosfat de calciu sau magneziu) sau albi și cristalini (fosfat amoniaco - magnezian).

◆ la o porțiune de calcul se adaugă două picături de acid azotic și tot atâta apă;

◆ se încălzește la fierbere și se diluează cu 3 ml apă distilată;

◆ la 1 ml soluție diluată se adaugă 3 ml reactiv molibdenic și se încălzește ușor;

◆ apare un precipitat galben ceea ce atestă prezența fosfaților;

◆ la 1 ml soluție se adaugă 1 ml acetat de sodiu 25%;

◆ se fierbe, după care se adaugă un exces de oxalat de amoniu;

◆ restul lichidului se filtrează și se alcalinizează filtratul de amoniu;

◆ se adaugă o soluție de fosfat de sodiu și dacă apare un precipitat cristalin de fosfat amoniaco - magnezian și relevă prezența magneziului;

◆ un fragment de calcul se încălzește ușor până la dizolvare într-o eprubetă cu două picături de hidroxid de sodiu 20%. se adaugă 1 ml din soluția de iodură de sodiu;

◆ apariția unui precipitat negru indică prezența amoniacului.

III. **Calculi bruni, verzi, negricioși**, foarte duri și muriformi.

■ un fragment se dizolvă într-o mică porțiune de acid azotic diluat 1/20;

■ se adaugă un exces de CH_3COONa 25%;

■ dacă se formează un precipitat alb, acesta denotă prezența oxalatului de calciu.

IV. **Calculi galbeni, translucizi**, ceroși cu radiații. Sunt solubili în HCl și NH_3. Încălzit în capsula de porțelan, calculul arde fără

să se topească, răspândește un miros picant și lasă un reziduu voluminos. Aceste indicii denotă prezența **cistinei**. Prezența calculilor urinari ne indică **litiaza renală sau vezicală**.

IV.3. LICHIDUL CEFALORAHIDIAN (LCR)

IV.3.1. GENERALITĂȚI DESPRE FIZIOLOGIA LCR

Lichidul cefalorahidian (LCR) este lichidul biologic format printr-un mecanism de secreție în plexurile coroide (65%), dar și extracoroid în elementele gliale din peretele ependimal (35% din totalul LCR).

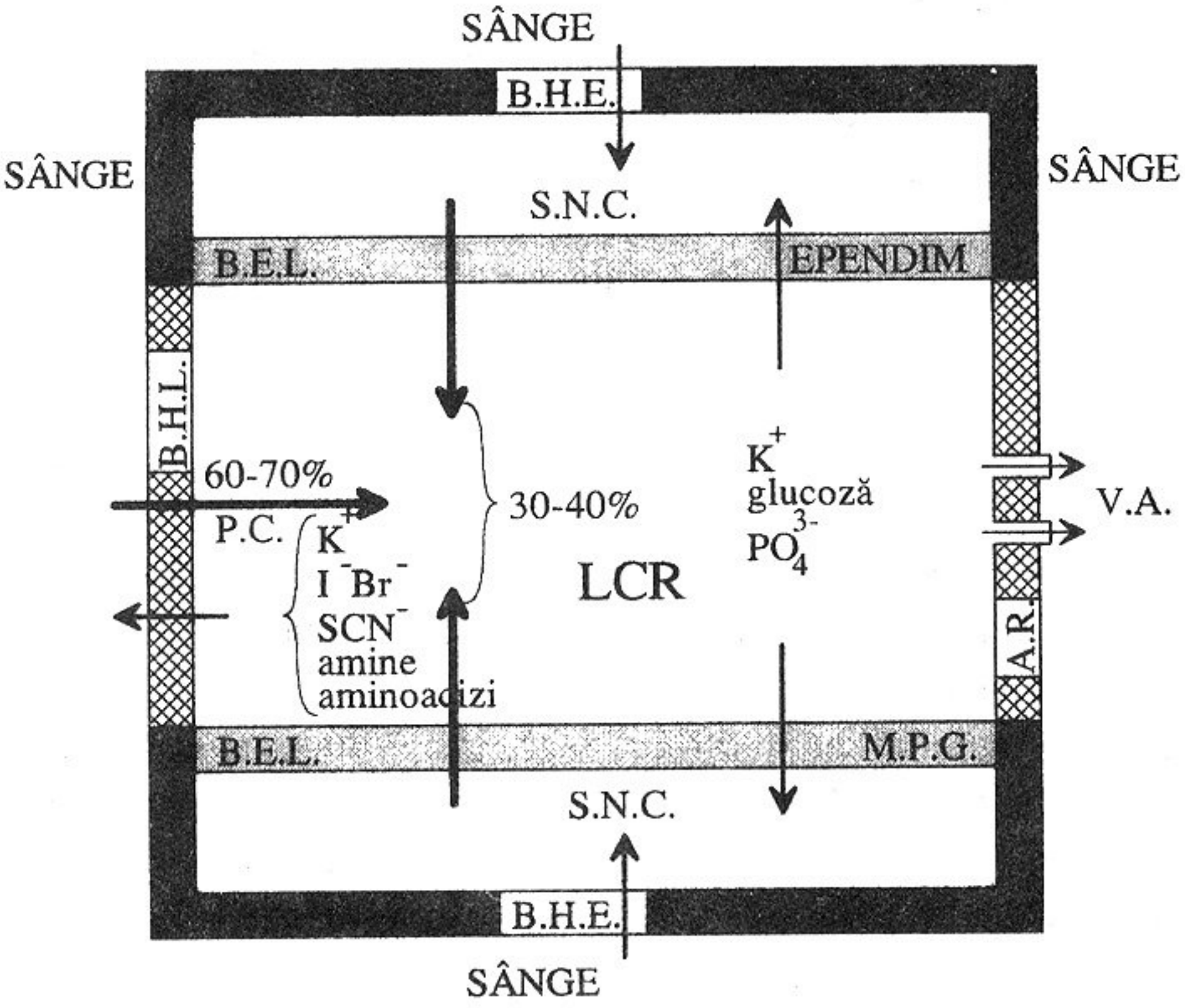


Fig.IV.6. **Sistemele de barieră ale SNC și spațiilor lichidiene.**
(B.H.E. = Bariera hemato - encefalică, B.H.L. = Bariera hemato - lichidiană, P.C. = Plexuri coroide, V.A. = Vili arahnoidieni, A.R. = Arahnoidă, M.P.G. = Membrană pio - glială, B.E.L. = Bariera encefalo - lichidiană.

Se consideră că lichidul cefalorahidian reprezintă o parte a lichidului interstițial, dar, spre deosebire de alte lichide interstițiale, LCR este separat de plasma sanguină printr-un sistem morfofuncțional care împiedică pătrunderea în spațiile lichidiene a substanțelor macromoleculare. Totodată se realizează un obstacol pentru difuziunea particulelor de dimensiuni mai mici, permițându-se difuziunea liberă a apei. Acest sistem s-a numit **bariera hemato - lichidiană** (B.H.L.).

Granița spațiului lichidian este la limita barierei dintre lichidul circulant (plasma sanguină) și spațiul extracelular al țesutului nervos cunoscut sub denumirea de barieră hematoencefalică.

Așadar, spațiile lichidiene și spațiul extracelular al sistemului nervos formează un sistem unic separat de spațiul intravascular prin bariera hemato - lichidiană și hemato - encefalică.

IV.3.2. FORMAREA LCR

Studiile realizate până în prezent au permis elaborarea unor concluzii în ceea ce privește formarea LCR:

- LCR nu este un dializat plasmatic, ci un produs de secreție a plexurilor coroide și al spațiului nervos extracoroid.
- plexurile coroide formează LCR prin mai multe mecanisme: difuzie simplă, secreție activă și pinocitoză. Cantitatea de lichid formată este de 0,17 - 0,23 ml LCR/ minut/ gram de țesut coroid.

IV.3.2.1. ROLURILE LCR

Importanța fiziologică a LCR decurge din raporturile acestuia cu sistemul nervos central (SNC). Se pot deosebi:

I. roluri biomecanice.

II. roluri biodinamice.

I. **Rolurile biomecanice ale LCR:**

- **Rolul de asigurare și menținere** a formei structurilor anatomice ale SNC.

◆ **Rolul de protecție** a formațiunilor nervoase față de efectul nociv al șocurilor și solicitărilor mecanice.

◆ **Rolul antigravitațional** deoarece LCR este perna lichidă pe care plutește masa encefalică și care are ca efect diminuarea influenței negative a accelerațiilor de intensitate variată din activitatea zilnică.

II. **Rolurile biodinamice ale LCR:**

► **Rolul limfatic** - rolul LCR de a colecta și elimina surplusul de lichid interstițial din masa tisulară a SNC.

► **Rolul de „canal"** („sink-action") ce constă în capacitatea de a asigura eliminarea unor specii moleculare care constituie surplusuri metabolice ale activității SNC.

■ **Rolul de transport** al unor hormoni spre celulele țintă.

■ **Rolul de realizare și menținere a homeostazei** mediului în care se realizează activitatea SNC.

IV.3.3. COMPOZIȚIA LCR

Lichidul cefalo - rahidian (L.C.R.) are o compoziție complexă conținând o serie de substanțe bioorganice și anorganice într-un mediu apos. Acestora trebuie să li se adauge celulele, componenta organizată.

TABELUL IV.12. COMPOZIȚIA LCR.

Componenta biochimică	Componenta celulară
► apă 99%; ► reziduu 1%: ■ substanțe bioorganice; ■ substanțe bioanorganice.	► celule imunocompetente; ► celule fagocitare mononucleate; ► celule polimorfonucleare; ► celule ajunse în LCR după recoltare; ► eritrocite; ► celule ale structurilor ce delimitează spațiile lichidiene.

Majoritatea speciilor moleculare din LCR își au originea în plasmă. Din LCR lipsesc o serie de substanțe care sunt prezente în

plasmă, precum: fibrinogen, protrombină, bilirubină, lipide, anumiți hormoni etc. Apariția acestora în LCR are o semnificație patologică.

IV.3.3.1. COMPONENTA BIOCHIMICĂ

Substanțele bioanorganice sunt în cantitate mai mare și, cu excepția calciului, în concentrații diferite de cele ale unui dializat plasmatic. Clorul este elementul care depinde cel mai mult de concentrația plasmatică, deoarece difuzează rapid și uniform prin epiteliile ce delimitează spațiile lichidiene.

Dintre substanțele bioanorganice din LCR, clorul, sodiul și magneziul sunt singurele ce se găsesc în cantitate mai mare decât în plasmă (vezi tabelul IV.13). Substanțele anorganice sunt eliminate prin difuzie (Na^+, K^+, Cl^-) sau secreție activă (Na^+, Mg^{2+}).

Substanțele bioorganice ajung în LCR fie prin difuzie simplă, fie prin intermediul unor mecanisme enzimatice de transport activ.

LCR conține proteine (albumine, globuline), glucide, acid lactic, cataboliți proteici (uree, creatinină, acid uric), aminoacizi, mediatori chimici (nucleotide ciclice), în cantități mult mai mici decât cele plasmatice (vezi tabelul IV.13).

În ceea ce privește componentele de natură lipidică, prin separarea electroforetică a lipoproteinelor din LCR s-a evidențiat doar o bandă caracteristică pentru α-lipoproteine, ceea ce înseamnă că în LCR se găsesc numai fosfolipide, dar în cantitate foarte mică (15,5 μg%). Prezența celorlalte fracțiuni lipoproteice este întotdeauna patologică.

LCR conține un număr redus de enzime cu activitate foarte mică. S-a evidențiat o activitate semnificativă a transaminazelor (mai ales GOT), a lactat dehidrogenazei (cu un spectru izoenzimatic diferit de cel plasmatic), a colinesterazei etc.

În cazul celor mai multe enzime din LCR, activitatea acestora crește odată cu înaintarea în vârstă.

De asemenea, ea se modifică semnificativ în cazul unor afecțiuni ale SNC, datorită permeabilizării membranelor sau proliferării unor celule străine de SNC.

TABELUL IV.13. COMPOZIȚIA BIOCHIMICĂ A LCR.

Substanța	Concentrația în LCR	Concentrația în plasmă
Substanțe bioanorganice (mEq/l)		
◆ Sodiu	140 - 150	145
◆ Potasiu	2,8 - 3,2	4
◆ Calciu	2,2 - 2,6	5
◆ Magneziu	2 - 2,5	2,05
◆ Clor	120 - 130	104
◆ Fosfor	1 - 1,8	3,5
Substanțe bioorganice (mg/100 ml)		
► Proteine	20 - 40	7500
► Albumine	15 - 30	4000
► Globuline	4 - 9	2500
► Fibrinogen	0	200 - 400
► Azot aminoacidic	1,6 - 2,7	4,4
► Uree	7,5 - 1,5	25
► Acid uric	0,5 - 2,6	4 - 7
► Creatinină	1,0 - 1,5	0,7 - 1,2
► Glucoză	45 - 80	60 - 110
► Acid lactic	1,55 - 2,2	0,53 - 0,86
► Fosfolipide	15,5	200
► Colesterol	0,06 - 0,5	200
► LDH (µmoli/min/l)	1,6 - 18,4	90
► GOT (µmoli/min/l)	1,9 - 12,9	14

Dintre enzimele LCR, doar creatinkinaza are valoare diagnostică, deoarece ea lipsește în LCR normal. Prezența sa indică o distrugere de substanță nervoasă, dar nu precizează natura procesului ce a provocat leziunea distructivă.

Tabelul IV.13. redă comparativ concentrațiile unor substanțe organice și anorganice în LCR și în plasmă.

IV.3.3.2. COMPONENTA CELULARĂ A LCR

Celulele conținute în LCR, deși reduse ca număr (0 - 24 celule/mm^3). prezintă o importanță deosebită, deoarece asigură imunitatea spațiilor lichidiene și a SNC. Componenta celulară a LCR prezintă și importanță clinică datorită modificărilor calitative și cantitative ce apar în diferite afecțiuni ale sistemului nervos.

Din punct de vedere calitativ, LCR poate conține diverse tipuri celulare:

- celule conținute în LCR normal provenit de la subiecți sănătoși (limfocite mici, granulocite neutrofile în număr redus);
- celule ajunse accidental în LCR ca urmare a puncției sau a altor manevre cu scop diagnostic (celule ependimare, coroidiene, arahnoidiene);
- celule prezente în LCR ca o consecință a unor procese patologice ce afectează SNC și meningele (neutrofile, plasmocite, celule tumorale etc.).

Examenul citologic calitativ și cantitativ este cea mai importantă investigare clinică a LCR, deoarece furnizează datele necesare pentru stabilirea unui diagnostic corect și a unei conduite terapeutice adecvate într-un număr mare de maladii ale SNC, mai ales în meningite și meningoencefalite.

IV.3.4. CARACTERISTICILE FIZICE ALE LCR

Tabelul IV.14. prezintă cele mai importante proprietăți ale lichidului cefalorahidian.

Lichidul cefalorahidian este un lichid ușor alcalin cu valoarea pH-ului cuprinsă între 7,30 - 7,35.

Menținerea echilibrului acido-bazic este realizată de sistemul bicarbonat-acid carbonic. pH-ul este mai scăzut decât cel al plasmei, deoarece LCR are concentrații mai mari de acid lactic și CO_2. Proteinele, fiind în cantitate redusă, nu contribuie foarte mult la menținerea pH-ului.

TABELUL IV.14. CARACTERISTICILE FIZICE ALE LCR.

Caracteristica	LCR normal
► aspect	limpede ca „apa de stâncă”
► culoare	incolor
► volum	100 - 200 ml
► greutate specifică	1,003 - 1,009
► pH	7,30 - 7,35
► indice refractometric	1,3349 - 1,3351
► presiune	copii: 5 - 10 mm H_2O adulți: 7 - 20 mm H_2O
► vâscozitate Oswald	1,01 - 1,06
► constantă stalagmometrică	101 - 105 picături
► conductibilitate electrică	0,01425 - 0,01549 Scm^{-1}
► punct de congelare	- 58ºC

În cazul unor afecțiuni ale SNC sau meningelor, unele caracteristici se modifică semnificativ.

Este cunoscut aspectul opalescent sau purulent al LCR în meningitele virotice, meningococice. De asemenea, în aceste situații LCR devine xantocromic, iar presiunea crește.

După accidente vasculare cerebrale sau puncții nereușite LCR devine sanguinolent.

IV.3.5. RECOLTAREA LCR

În mod normal, LCR se recoltează prin puncție lombară cu pacientul în poziție șezând sau culcat lateral.

În situații speciale, LCR se poate recolta prin puncție suboccipitală, ventriculară sau combinată.

Investigarea chimică a LCR presupune:

- determinarea proteinorahiei și separarea electroforetică a proteinelor din LCR;
- determinarea glicorahiei;
- determinarea clororahiei;
- identificarea triptofanului (în meningită tuberculoasă);

• identificarea acetonei (la persoanele diabetice în comă).

Pentru a completa rezultatele determinărilor biochimice se analizează componenta celulară ce se modifică specific în diferite afecțiuni.

Trebuie menționat că nu se poate stabili un diagnostic corect numai pe baza modificării compoziției LCR, ci este necesară o investigare suplimentară.

IV.4. SALIVA.

IV.4.1. FORMAREA SALIVEI

Secreția salivară este rezultatul activității celor trei perechi de glande salivare anexate cavității bucale:

► **glandele parotide** ce au o secreție fluidă și transparentă (saliva de diluție);

► **glandele submaxilare** a căror secreție este mai vâscoasă și are rol în gustație;

► **glandele sublinguale** ce secretă saliva de deglutiție, bogată în mucină, ce are rol în formarea bolului alimentar.

În pereții mucoasei bucale, mai ales în zona palatină și labială, sunt dispersate glande salivare accesorii a căror contribuție la formarea salivei este mai redusă.

În condiții normale de viață, secreția salivară este produsă reflex în două moduri: prin stimularea nervilor bucali de către alimente sau alte substanțe și prin stimularea unui alt organ de simț decât cel al gustului.

Saliva se formează prin secreție acinoasă și absorbție și secreție tubulară, reprezentând cea mai mare dintre secrețiile digestive raportată la gram de țesut glandular.

Celulele acinare secretă, în porțiunea de început a tubilor, o salivă inițială ce conține Na^+, K^+, H_2O, HCO_3^-, uree, aminoacizi, în concentrații izotonice cu plasma.

Această soluție primară își modifică apoi compoziția prin schimburi cu sângele din capilarele din jurul tubilor, înainte de a atinge canalele excretoare. Se secretă activ K^+ și se reabsoarbe ionul Na^+.

Reabsorbția ionilor Na^+ și eliminarea celor K^+ este un proces activ realizat de ATP-aza Na/K împotriva unui gradient de concentrație. ATP-aza Na/K din tubii salivari este stimulată de hormonii mineralcorticoizi (aldosteron) ce influențează procesul într-o manieră analoagă acțiunii la nivel renal. Se mai secretă anioni I^-, HCO_3^- și se reabsoarbe Cl^-.

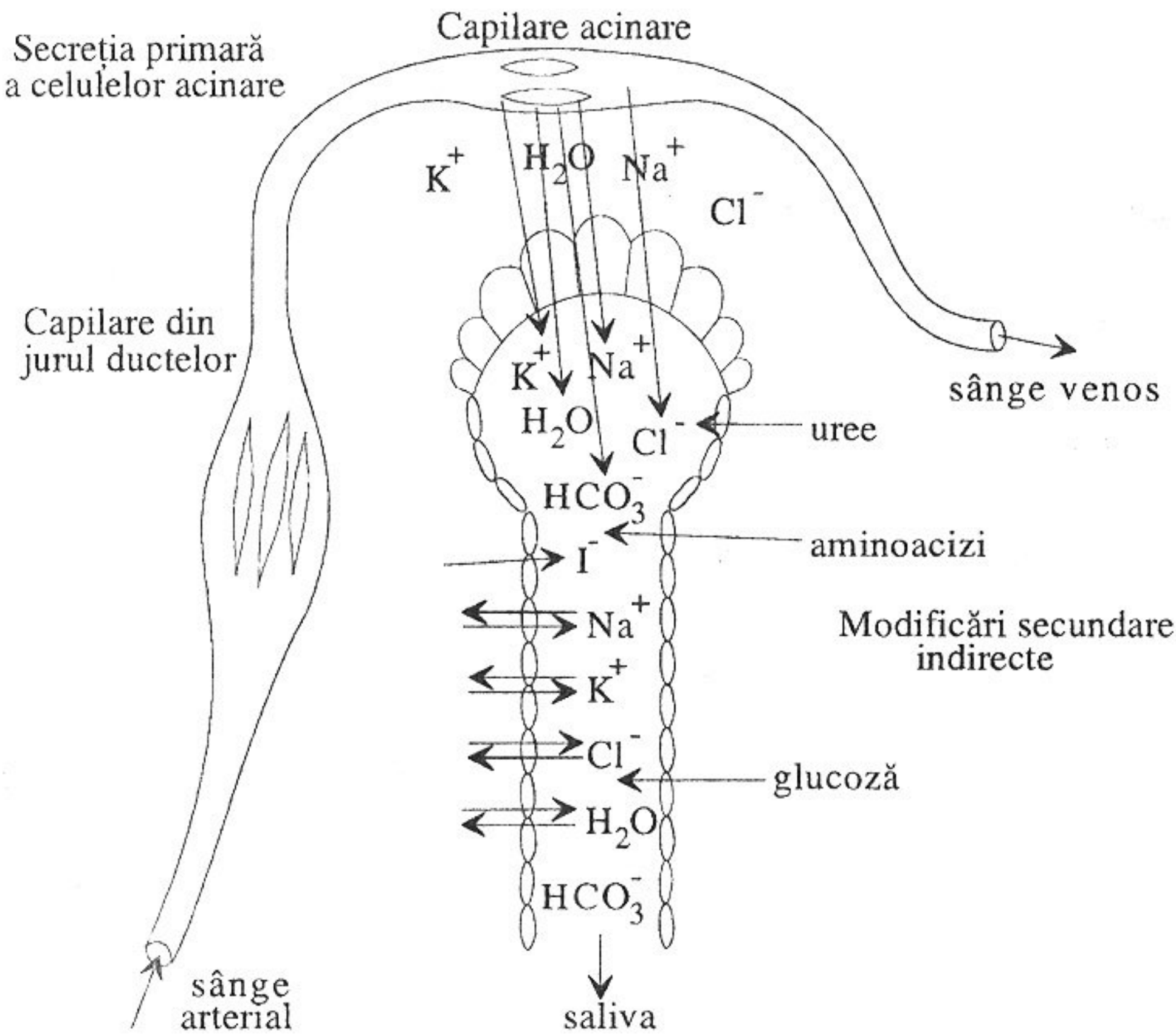


Fig.IV.7. **Schimbul de electroliți diferențiat la nivel acinar și al ductului salivar.**

Schimburile ionice la nivelul glandelor salivare sunt favorizate de circulația sanguină care se face în contracurent printr-un veritabil sistem port dispus în serie (figura IV.7.).

Saliva finală este hipotonă, deoarece predomină procesele de reabsorbție a ionilor față de secreție. Cu toate că gradientul osmotic al plasmei este mai ridicat decât cel al salivei, se reabsoarbe doar o cantitate redusă de apă prin pereții ductelor, din cauza permeabilității scăzute a epiteliului canalelor față de apă.

În cazul în care rata fluxului salivar crește, timpul de reabsorbție este mai scurt, ceea ce determină creșterea cantității de ioni Na^+ și HCO_3^- din salivă. Alte substanțe conținute în salivă se elimină prin difuzie pasivă (de exemplu: ureea).

Reglarea secreției salivare se realizează pe calea impulsurilor nervoase, glandele salivare fiind puțin controlate hormonal. Totuși anumiți hormoni intensifică secreția salivară (aldosteronul, hormonul somatotrop), în timp ce alți hormoni reduc volumul de salivă excretat (hormonul antidiuretic ce limitează și în acest fel pierderile de lichide din organism).

IV.4.2. COMPOZIȚIA SALIVEI

Saliva este un lichid incolor, opalescent, insipid, a cărui vâscozitate depinde de proveniența și condițiile de secreție.

Saliva conține 99,4% apă și 0,6% reziduu uscat reprezentat de substanțe organice și anorganice.

Saliva mai conține în cantitate redusă glucoză, diferite gaze (O_2, N_2), fosfolipide și nucleoproteine.

La fumători, saliva are un conținut crescut de ioni tiocianat (SCN^-), rezultați din metabolismul proteic.

Saliva nou născuților conține lipază ce are rolul de a hidroliza tributirina din lapte.

Glicoproteinele din sistemul ABO conținute de salivă la 75% din populație prezintă importanță pentru medicina legală.

Cantitatea de acid lactic eliminată în salivă crește în urma unor eforturi fizice accentuate.

TABELUL IV.15. COMPOZIȚIA SALIVEI.

Substanțe bioanorganice	◆ cationi: Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} ◆ anioni: - Cl^-, F^-, I^- - bicarbonat (HCO^-_3) - fosfați - $H_2PO^-_4$ - HPO^{2-}_4 - SCN^-
Substanțe bioorganice	◆ mucină ◆ proteine salivare ◆ enzime - α-amilaza - lipaza - lizozim - kalicreină ◆ substanțe azotate neproteice - uree - creatinină - acid uric ◆ aminoacizi ◆ acid lactic ◆ antigene de grup sanguin

IV.4.3. CARACTERISTICILE FIZICO-CHIMICE ALE SALIVEI

Volumul salivar. La om se secretă zilnic 1000 - 1500 ml de salivă. În repaus, din volumul total de salivă, 70% este salivă submaxilară, 25% salivă secretată de parotide, 4% salivă sublinguală și doar 1% este secreția glandelor mucoase dispersate.

Volumul de salivă eliminat variază cu vârsta, sarcina, momentul diurnal, starea psihică a organismului.

În somn, secreția de salivă este minimă (debitul salivar este de 0,05 ml/min).

Cu vârsta, secreția de salivă se reduce, deoarece parenchimul glandelor salivare este înlocuit de țesut conjunctiv și adipos.

Secreția de salivă este mult mai mică în perioada sarcinii, datorită tendinței de retenție hidrică.

pH-ul salivar. Saliva are o reacție slab acidă, pH-ul fiind cuprins între 6,35 - 6,85. pH-ul salivar scade cu vârsta, până la 60 de ani, după care acidifierea încetează. Valori mai mici se înregistrează și la gravide. După masă, pH-ul salivar scade, bicarbonatul conținut de salivă contribuind la reechilibrarea valorii sale.

Densitatea. Saliva conține substanțe bioorganice și bioanorganice dizolvate în apă, având o densitate cuprinsă între 1,003 - 1,008.

Capacitatea de tamponare a salivei este remarcabilă exercitându-se prin următoarele sisteme tampon care se opun acidifierii sau alcalinizării salivei:

- acid carbonic / bicarbonat;
- fosfat monobazic / fosfat bibazic;
- proteinat acid / proteinat bazic.

Vâscozitatea salivei este variabilă între 1,08 - 1,32 unități și este conferită de prezența mucinei și a proteinelor salivare.

Vâscozitatea variabilă în raport cu glanda care secretă saliva: saliva sublinguală este foarte vâscoasă, saliva submaxilară are o vâscozitate medie, iar cea secretată de glandele parotide este foarte diluată.

IV.4.4. ROLURILE SALIVEI

Saliva îndeplinește funcții multiple: digestive, extradigestive, locale și generale, integrate în economia întregului organism.

I. **Rolurile digestive** pot fi rezumate astfel:

► facilitează masticația și deglutiția, lubrifiind mucoasa și alimentele;

► solubilizează substanțele solide alimentare pentru a le pune în contact cu papilele gustative ce vor fi stimulate, dând senzația de gust;

► hidrolizează amidonul sub acțiunea α-amilazei (ptialina);

► lubrifiază mucoasa bucală și linguală, favorizând vorbirea.

II. **Rolurile nedigestive** ale salivei sunt următoarele:

- ◆ acțiunea anticarie realizată prin:
  - ■ prezența unor substanțe bactericide (lizozim, bactericidine);
  - ■ spălarea cavității bucale de reziduurile alimentare;
  - ■ prezența fluorului;
  - ■ capacitatea de tamponare a acizilor rezultați prin descompunerea alimentelor și din activitatea microorganismelor;
- ◆ reprezintă o cale de eliminare a unor substanțe exogene ajunse accidental în organism (Hg, Pb) sau a microorganismelor (virusurile oreionului, poliomielitei, turbării);
- ◆ eliminarea unor compuși endogeni (uree, SCN^-);
- ◆ rol în mentinerea echilibrului hidroelectrolitic, reflectând starea de deshidratare a organismului.

IV.4.5. RECOLTAREA SALIVEI

Pentru recoltarea salivei în diverse scopuri se pot folosi metode experimentale sau metode clinice.

Metodele experimentale se bazează pe realizarea unor fistule salivare temporare, prin introducerea unor canule în canalul de secreție al glandei, sau permanente, prin exteriorizarea canalului la suprafața pielii.

Metodele clinice se bazează pe drenaj și sucțiune.

Drenajul constă în recoltarea salivei totale scurse peste buza inferioară. Subiectul este obligat la o respirație orală prin pensarea narinelor, aceasta stimulând secreția salivară.

Sucțiunea constă în recoltarea prin aspirație a salivei cu ajutorul unei pompe de vid cu apă sau mecanice, așa cum se procedează în cabinetele stomatologice. Saliva se mai poate recolta prin canularea (introducerea unui tub de plastic) canalului excretor salivar.

În salivă se pot face anumite determinări calitative și cantitative pentru a analiza caracteristicile și compoziția acesteia în diferite situații patologice.

IV.5. EXTRACTE TISULARE

IV.5.1. GENERALITĂȚI

Explorarea metabolismului celular se poate face prin metode indirecte și directe, ambele putându-se efectua în condiții fiziologice sau patologice.

Metodele **indirecte** de investigare presupun:

- dozarea unor metaboliți în lichidele biologice;
- determinarea activității enzimelor în unele lichide biologice;
- probe funcționale de încărcare sau de toleranță care explorează funcții specifice.

Aceste metode nu sunt specifice, compușii dozați fiind rezultatul unor procese metabolice desfășurate în diferitele țesuturi. Ele sunt accesibile laboratorului clinic și au implicații în scop diagnostic.

Metodele **directe** presupun determinări pe fragmente de țesut prelevate de la diferite animale de experiență. Acestea se prelucrează pentru obținerea unor extracte tisulare în soluții tampon adecvate componentelor investigate.

Rezultatele determinărilor realizate pe extracte tisulare obținute de la animalele de experiență nu pot fi extrapolate în totalitate la subiecții umani.

De aceea, cel mai util mijloc de investigare este studiul pe fragmente de țesut uman prelevate în timpul intervențiilor chirurgicale sau pe puncții bioptice din organele analizate.

IV.5.2. EXTRACTE TISULARE UMANE

Determinările pe țesuturi umane folosesc cantități mici de material și, de aceea, trebuie realizate prin metode de analiză foarte sensibile și specifice.

Pentru obținerea de extracte tisulare în scopul determinării unor parametri enzimatici cel mai indicat este ficatul.

Recoltarea țesuturilor umane se poate realiza în trei moduri diferite:

◆ **Autopsia**. Materialul prelevat la autopsie are dezavantajul că nu reflectă exact starea organismului înainte de deces, deoarece post-mortem au loc modificări de intensități diferite ale unor activități enzimatice în toate organele. Trebuie avute în vedere modificările din faza agonală, iar în cazul decesului subit, modificările din cursul șocului.

◆ **Biopsia intraoperatorie**. În timpul unei intervenții chirurgicale se prelevează 1-2 g din organul ce urmează a fi investigat, fără ca aceasta să afecteze activitatea organismului.

Recoltarea unor fragmente hepatice de câteva grame este lipsită de nocivitate, având în vedere marea capacitate de regenerare a ficatului.

◆ **Puncția biopsie**. Acest tip de analiză se practică în scopul obținerii unor rezultate care să indice cu precizie diagnosticul în cazul afectării unui annumit organ.

Din punct de vedere al importanței informațiilor oferite, cele mai practicate sunt:

- puncție splenică;
- puncție hepatică;
- puncție neduloosoasă;
- puncție ganglionară.

Pentru puncție se folosesc ace speciale cu lumen suficient de larg pentru a se putea recolta un fragment de țesut ce poate fi fructificat histopatologic.

Acele de puncție sunt ace lungi și subțiri (10 cm lungime și 0,8 mm diametru sau 12-13 cm lungime și 1,2-2 mm în diametru) prevăzute cu mandreu, care nu trebuie să lezeze țesutul vecin zonei puncționate.

Se mai pot folosi și acele simple utilizate pentru injecții intracutanate.

În cazul bolilor metabolice se practică puncția hepatică ce oferă material pentru examinarea biochimică, enzimatică și histopatologică.

Pentru obținerea unor rezultate corecte se aspiră cu ajutorul acului Menghini cilindri de parenchim ce cântăresc 10-20 mg, cu o lungime de 10 mm și 1,5 mm lățime. Materialul recoltat este reprezentativ pentru tot organul.

Deoarece se recoltează cantități foarte mici de țesut trebuie ca metodele folosite să fie foarte sensibile (micrometode).

În timpul determinării, fragmentele rezultate trebuie analizate rapid și, dacă se poate, la rece pentru a preveni alterarea.

Imediat după recoltare fragmentele de organ sunt cântărite rapid, dacă se poate într-o cameră frigorifică, la o balanță de torsiune sau electromagnetică, cu o precizie superioară. În lipsa unor balanțe speciale se pot folosi balanțe analitice pentru a cântări fragmentele rezultate în vase cărora li s-a făcut tara.

IV.5.3. OMOGENIZAREA MATERIALULUI DE BIOPSIE

Omogenizarea materialului de analizat înainte de a obține extractul se referă la mărunțirea țesutului în scopul distrugerii membranelor celulare și eliberării conținutului celular într-un mediu de extracție hipotonic sau izotonic, în funcție de tipul de determinare ce urmează a fi realizată.

De aceea, pentru a realiza mărunțirea, se folosesc diferite tipuri de omogenizare.

Omogenizatorul cu cuțite (Utra-Turrax) este necesar atunci când se dorește o extracție completă a enzimelor localizate în diferitele compartimente celulare și este necesară liza membranelor organitelor subcelulare. Pentru obținerea unui astfel de omogenat se folosesc medii de extracție hipotonică.

Omogenizatorul Potter-Elvejhem realizează o omogenizare mai blândă, într-un mediu izotonic, care nu distruge organitele subcelulare. Omogenizatorul este alcătuit dintr-un vas de sticlă și un pistil care se rotește cu ajutorul unui motor (figura IV.8.).

În cazul în care se face determinarea pe un fragment de țesut obținut după o puncție biopsie, datorită cantității mici de țesut trebuie

folosite omogenizatoare mai mici. Microomogenizatorul folosit în acest caz este alcătuit dintr-o eprubetă de sticlă specială și un pistil care va fi acționat manual.

Centrifugarea. După suspendarea materialului rezultat în mediul de extracție și omogenizarea lui urmează etapa de separare a extractului printr-o fracționare diferențială într-o centrifugă. Se separă diferitele fracțiuni subcelulare (mitocondrială, nucleară) de supernatantul celular (citoplasma).

În cele două fracțiuni se vor determina activitățile enzimatice dorite, iar rezultatele, pentru a putea fi interpretate corect, trebuie raportate la o bază de referință. Se poate face raportarea în diferite moduri:

- raportarea la greutatea umedă (a țesutului imediat după prelevare);
- raportarea la greutatea uscată, folosită mai des în studiile de histochimie cantitativă;
- raportarea la cantitatea de proteine din omogenatul tisular sau din fracțiunile subcelulare determinate prin metoda cantitativă Lowry;
- raportarea la cantitatea de ADN.

Cea mai folosită bază de referință este cantitatea de proteină la extractul total exprimarea făcându-se în **unități de activitate enzimatică/mg proteină**, deoarece majoritatea proteinelor celulare au funcție enzimatică.

Determinările în extracte tisulare sunt influențate de anumiți factori ce caracterizează mediul de extracție:

- timpul de extracție;
- temperatura de extracție;
- pH-ul și tăria ionică a soluției tampon în care se face omogenizarea.

Condițiile optime de extracție se stabilesc prin încercări în cazul fiecărei enzime extrase dintr-un anumit țesut.

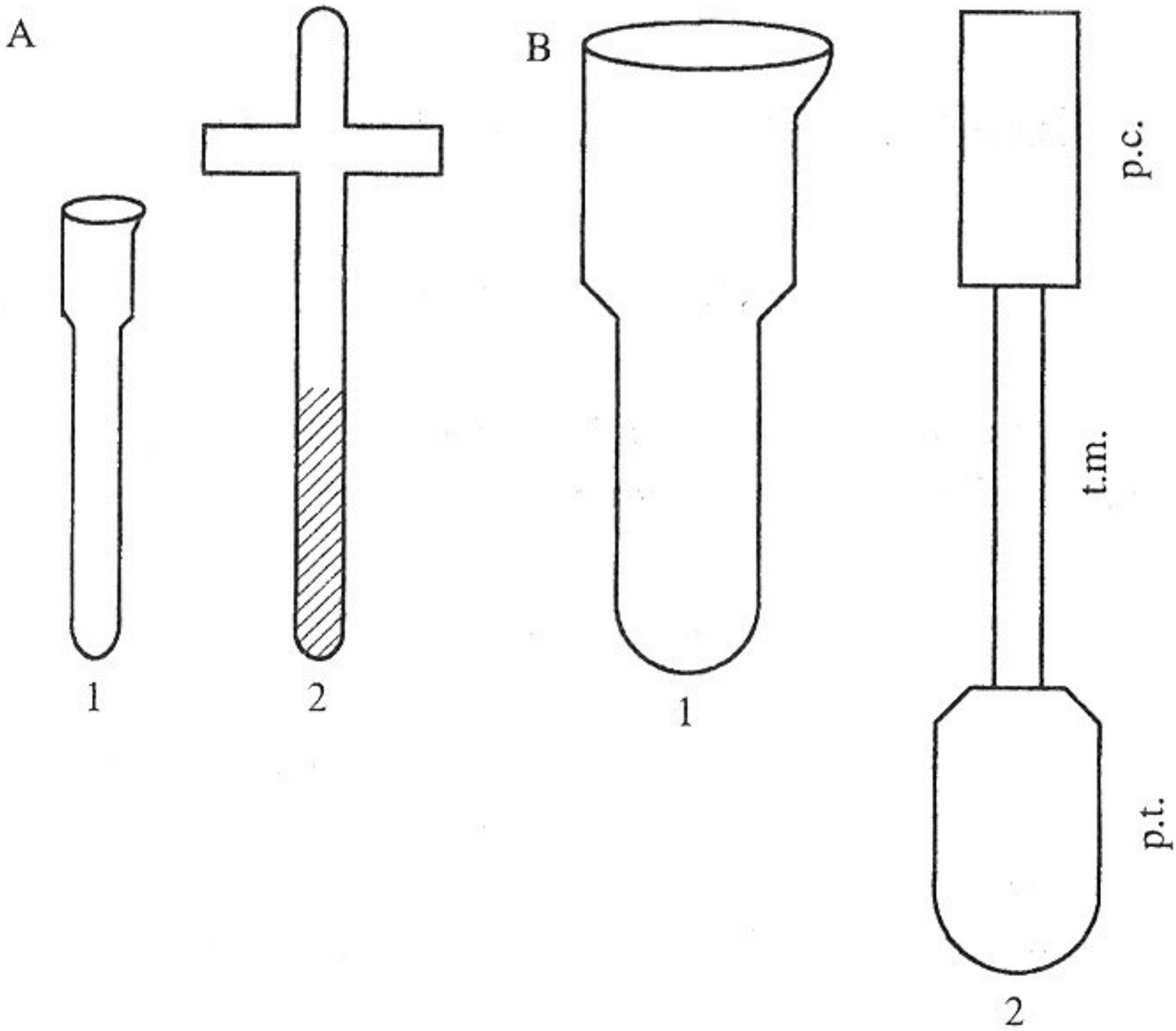


Fig.IV.8. **Diferite tipuri de omogenizatoare.**

A. Microomogenizator. 1. eprubetă din sticlă rodată; 2. pistil de sticlă rodată.

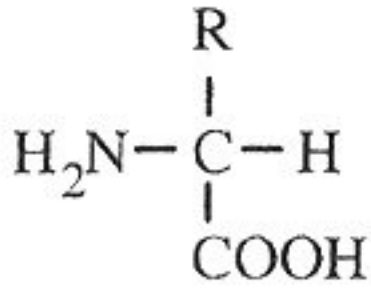
B. Omogenizator de tip Potter-Elvejhem. 1. vas de sticlă; 2. pistil alcătuit dintr-o piesă de teflon (p.t.) pentru strivirea țesutului, tijă metalică (t.m.) și piesă de cauciuc (p.c.) care poate fi adaptată la un motor.

În cazul dozărilor unor componente din extractele tisulare, trebuie să se țină seama de diluția datorată deproteinizării, precum și de conținutul în apă al țesutului (75% pentru ficat, miocard, mușchi și 80% în cazul sângelui).

V. BIOCHIMIA ANALITICĂ CALITATIVĂ

V.1. AMINOACIZI

Aminoacizii sunt unitățile structurale ale biomacromoleculelor proteice și au următoarea formulă generală:



De la această formulă fac excepție **prolina** și **hidroxiprolina**, care au o funcțiune amino secundară inclusă într-un ciclu pirolic, fiind de fapt doi **iminoacizi.**

Aminoacizii pot fi identificați prin reacții generale și specifice (particulare).

Reacțiile **generale** care servesc la identificarea aminoacizilor se datoresc prezenței în moleculă a grupărilor -COOH (carboxil) și -NH_2 (amino), iar cele **specifice** sunt determinate de existența diverselor grupări funcționale cuprinse în radicalii acestora (-OH, -SH, imidazol, guanido, fenil, etc.).

Dintre numeroasele reacții generale sau particulare (specifice) pe care le prezintă unii aminoacizi, vor fi precizate numai acelea care au importanță **medicală** și care sunt amintite în tabelul V.1.

V.1.1. REACȚII GENERALE DE IDENTIFICARE

V.1.1.1. FORMAREA DE SĂRURI COMPLEXE

Principiu. α-aminoacizii formează cu sărurile de cupru, cadmiu, nichel, plumb, săruri complexe interne sau chelatice care sunt colorate, stabile și greu solubile.

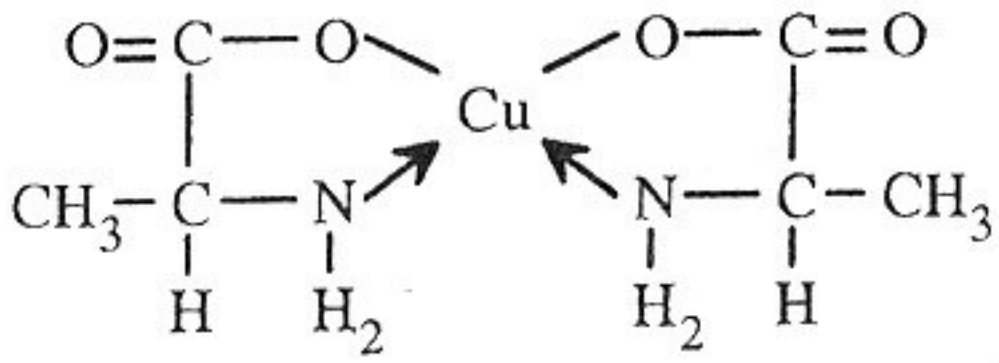
TABELUL V.1. REACȚII DE IDENTIFICARE ALE AMINOACIZILOR.

R	Tipul de reacție	Numele reacției	Pozitivă pentru
GENERALE	◆ formarea de săruri complexe;	–	► toți aminoacizii
	◆ reacția cu acidul azotos;	Van Slyke	► toți aminoacizii
	◆ reacția cu formaldehida;	Sörensen	► toți aminoacizii
	◆ reacția cu ninhidrina	Ruheman	► toți aminoacizii
PARTICULARE	◆ reacția cu HNO_3	Xantoproteică	► fenilalanina ► tirozina
	◆ reacția cu $HgNO_3$	Millon	► tirozina
	◆ reacția cu acidul diazobenzensulfonic	Pauly	► histidina ► tirozina
	◆ reacția cu α naftol ◆ reacția cu 8-oxi-chinoleina	Sakaguchi - Weber	► arginina ► arginina
	◆ reacția cu aldehide	Adamkiewics - Hopkins - Cole	► triptofan
	◆ reacția cu hidroximetilfurfural	Pettenkofer	► triptofan
	◆ reacția cu isatina	–	► prolina ► oxiprolina
	◆ reacția cu acetat de plumb	–	► cisteina ► metionina
	◆ reacția cu nitroprusiat de sodiu	–	► cisteina ► metionina

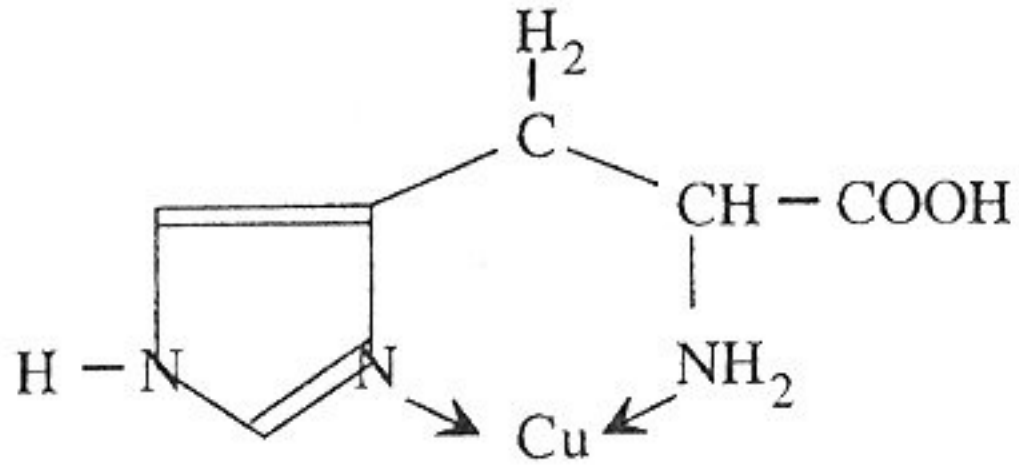
Metalul care intră în structura complexului colorat se leagă de aminoacid prin intermediul oxigenului și prin perechea de electroni neparticipanți ai grupei amino.

Exemple:

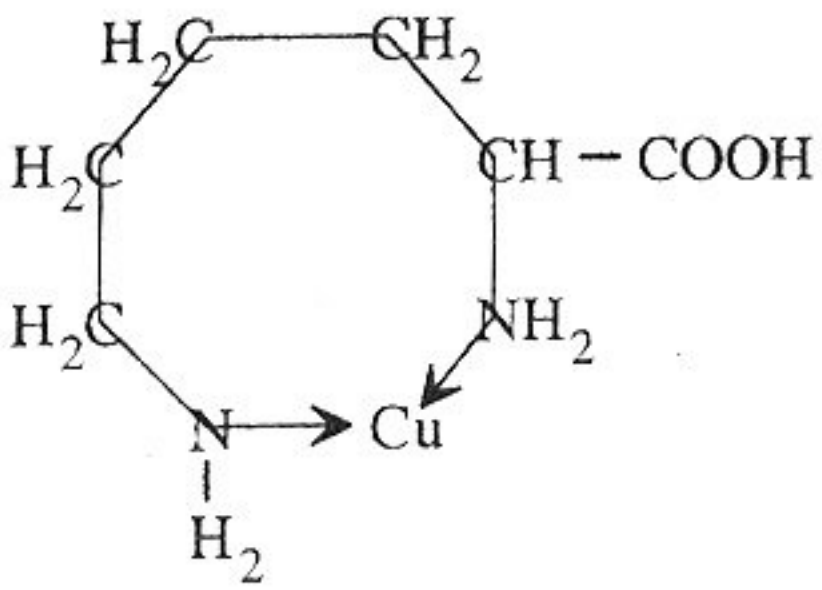
► cuprul formează cu α-alanina un complex cu structura:



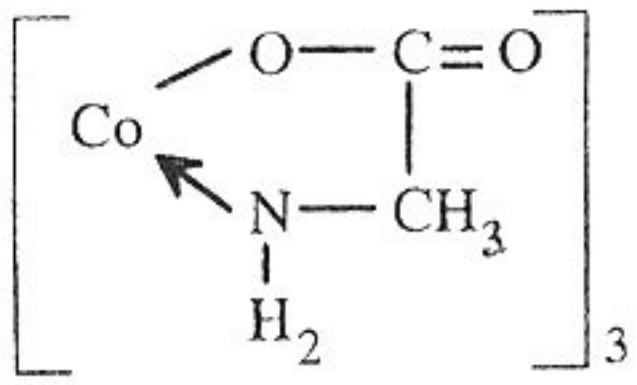
► cuprul formează cu histidina un complex intramolecular:



► cuprul formează cu acizii diaminomonocarboxilici complecși intramoleculari de tipul:



► cobaltul formează cu trei molecule de glicocol o sare complexă cu numărul de coordinație 6:



Reactivi:

- soluție de aminoacid 1%;
- soluție de NaOH 10%;
- soluție de sulfat de cupru 1%.

Tehnica de lucru:

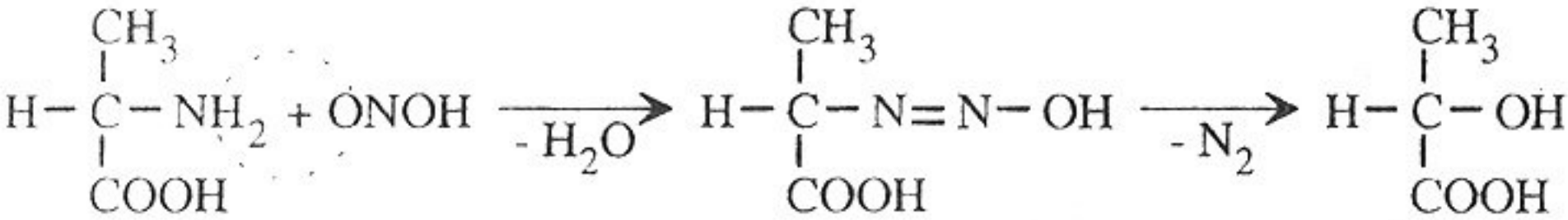
► într-o eprubetă se introduc 1 - 2 ml soluție de aminoacid 1% (glicocol, alanină, etc.);

► se adaugă circa 1 ml NaOH 10%;

► soluția de $CuSO_4$ 1% se adaugă picătură cu picătură până la apariția unei colorații **albastre intense**.

V.1.1.2. REACȚIA CU ACIDUL AZOTOS (VAN SLYKE)

Principiul reacției. Acidul azotos produce o dezaminare a aminoacizilor cu degajare de N_2. Reacția decurge conform schemei de mai jos:



α -alanina — acid lactic

Această metoda a fost mult utilizată la dozarea azotului aminic al aminoacizilor și proteinelor.

Reactivi:

- soluție de aminoacizi 5% (glicocol, alanină, etc.);
- soluție de $NaNO_2$ 5%;
- soluție de CH_3COOH 2 n.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc circa 2 ml soluție aminoacid 5%;

► se adaugă circa 2 ml $NaNO_2$ 5%;

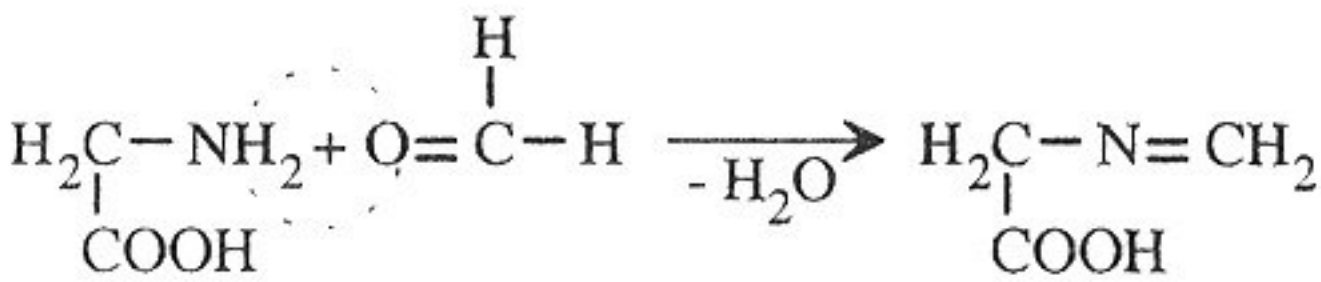
► se adaugă 2 ml soluție de CH_3COOH 2 n;

► se încălzește eprubeta în flacără sau în baie de apă;

► se observă o degajare de gaz (N_2) al cărui volum se poate măsura cantitativ.

V.1.1.3. REACȚIA SÖRENSEN (CU ALDEHIDELE)

Principiul reacției. Prin tratarea α-aminoacizilor cu formaldehidă se blochează gruparea amino cu formare de **bază Schiff** sau derivați azometinici, iar gruparea carboxilică liberă va acidifia mediul, fapt pus în evidență cu ajutorul indicatorului roșu de metil.



Reactivi:

- ◆ soluție glicocol 2%;
- ◆ formol;
- ◆ roșu de metil 1%.

Tehnica de lucru:

- ► într-o eprubetă se introduc circa 2 ml soluție glicocol 2%;
- ► se adaugă 1 - 2 picături roșu de metil;
- ► se observă apariția unei colorații galbene ceea ce indică un pH peste 6,2 (roșul de metil virează între 4,4 - 6,2);
- ► prin adăugarea a 2 ml formol, coloratia virează spre roz ca urmare a scăderii pH-ului;
- ► pentru determinarea cantitativă a aminoacizilor.

V.1.1.4. REACȚIA CU NINHIDRINĂ

Principiul reacției. Toți aminoacizii formează cu ninhidrina (hidratul tricetohidrindenului) un compus colorat albastru violet, denumit „**purpura lui Ruheman**". Fac excepție prolina și hidroxiprolina care formează un compus colorat în galben, respectiv portocaliu, datorită structurii lor iminice.

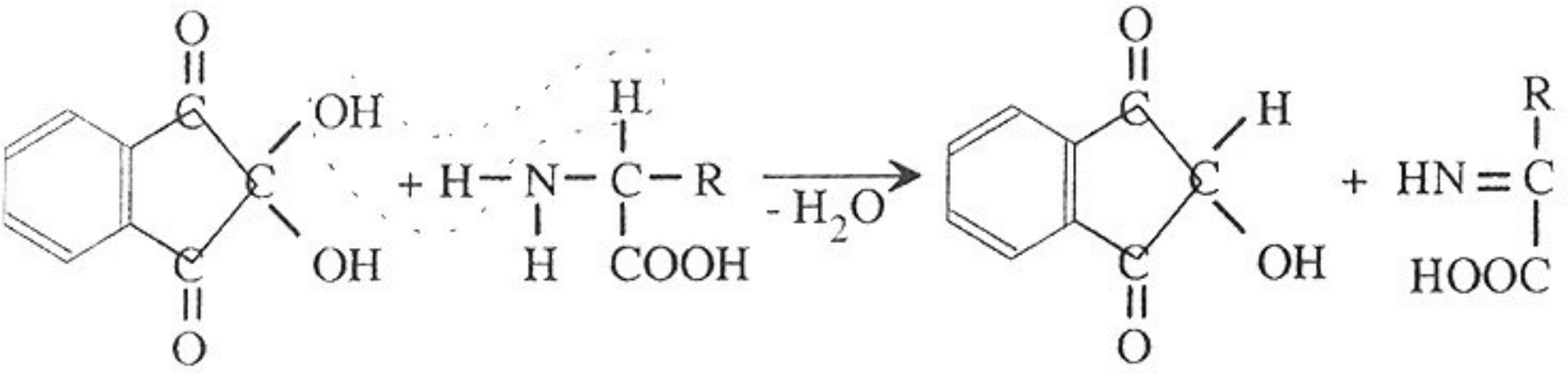
În afară de aminoacizi, reacția cu ninhidrina este pozitivă pentru peptide și proteine, dar culoarea se formează cu întârziere și cu o intensitate redusă. Reacția este dată de prezența simultană a grupărilor amino și carboxil, având loc la cald în soluție neutră sau slab bazică.

Reacția cu ninhidrină este foarte importantă, deoarece **este cea mai utilizată reacție** pentru developarea cromatogramelor ce separă:

- **aminoacizii liberi din lichide biologice;**
- **aminoacizi rezultați din hidrolizate proteice;**
- **dozarea colorimetrică a aminoacizilor.**

Fazele reacției sunt următoarele:

◆ într-o primă etapă are loc oxidarea aminoacidului la iminoacid, reducerea ninhidrinei și eliberarea unei molecule de apă;

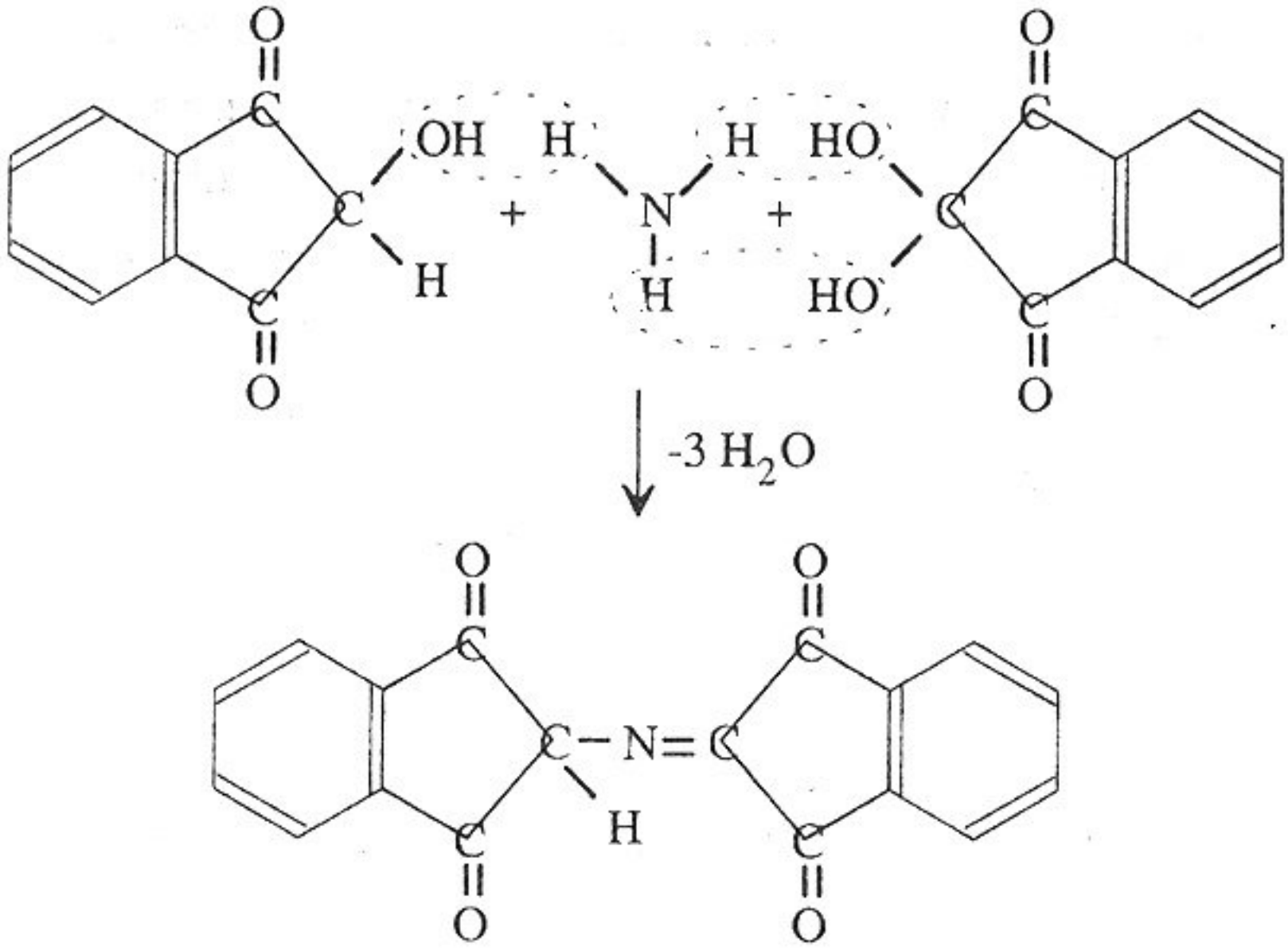


Tricetohidrinden (ninhidrina) | Ninhidrină redusă | Iminoacid

◆ în prezența apei și la cald, iminoacidul rezultat eliberează o moleculă de aldehidă, una de dioxid de carbon și alta de amoniac;

Iminoacid | Aldehidă

◆ în ultima fază a reacției, o moleculă de tricetohidrinden reacționează cu amoniacul și o moleculă de ninhidrină redusă, dând naștere unui complex colorat în albastru - violet denumit „**purpura lui Ruheman**" care absoarbe specific la $\lambda = 540$ nm.



Reactivi:

- soluție de aminoacid 0,1%;
- soluție de ninhidrină 0,1% în acetonă, alcool etilic sau butanol.

Tehnica de lucru:

- într-o eprubetă se adaugă 1 - 2 ml soluție aminoacid 0,1%;
- se adaugă 1 ml soluție de ninhidrină 1%;
- se încălzește pe o baie de apă 1 - 2 minute;
- apare o coloratie albastră violetă („purpura lui Ruheman").

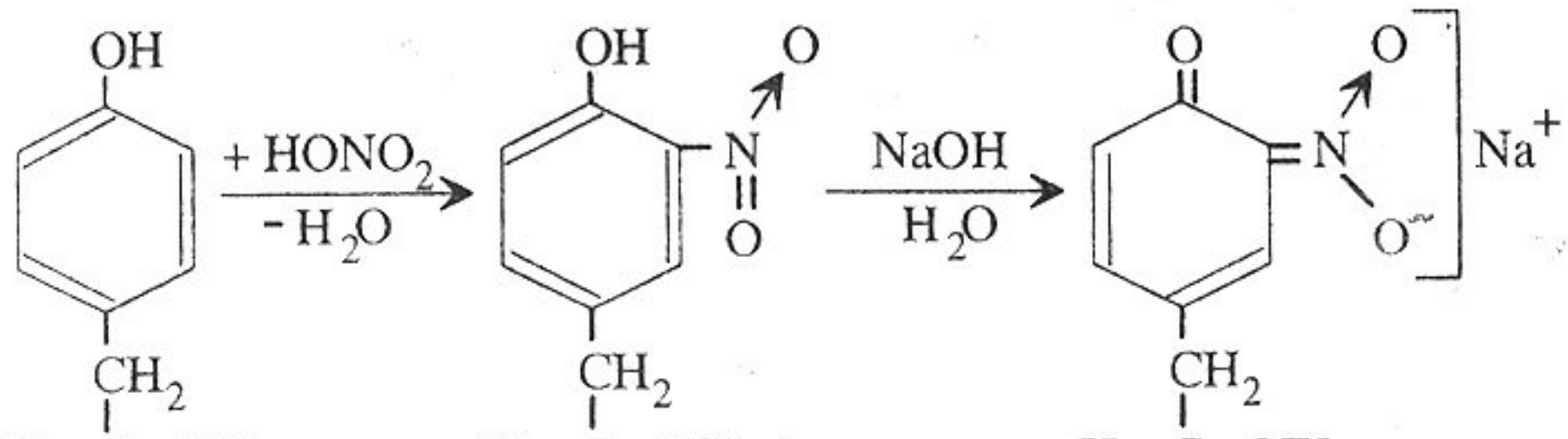
V.1.2. REACȚII PARTICULARE

V.1.2.1. REACȚIA XANTOPROTEICĂ

Principiul reacției. Aminoacizii care conțin în structura lor nucleul benzenic (fenilalanina, tirozina), ca și în proteinele unde sunt prezenți, în prezența acidului azotic concentrat formează nitroderivații corespunzători, de culoare galbenă.

După alcalinizare și la încălzire acești compuși trec în formele tautomere care, datorită structurii lor chinoidice, sunt mai intens colorate.

Reacția xantoproteică este dată cel mai ușor de **tirozină** și mai greu de fenilalanină și triptofan. Cu tirozina reacția decurge astfel:



Tirozina — Nitroderivatul tirozinei — Forma chinoidă

Reactivi:

- soluție de fenilalanină, tirozină 1% în HCl concentrat;
- soluție de ovalbumină;
- HNO_3 concentrat;
- NaOH 10%.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc 1 - 2 ml soluție de tirozină sau ovalbumină;

► se adaugă 1 ml HNO_3 concentrat;

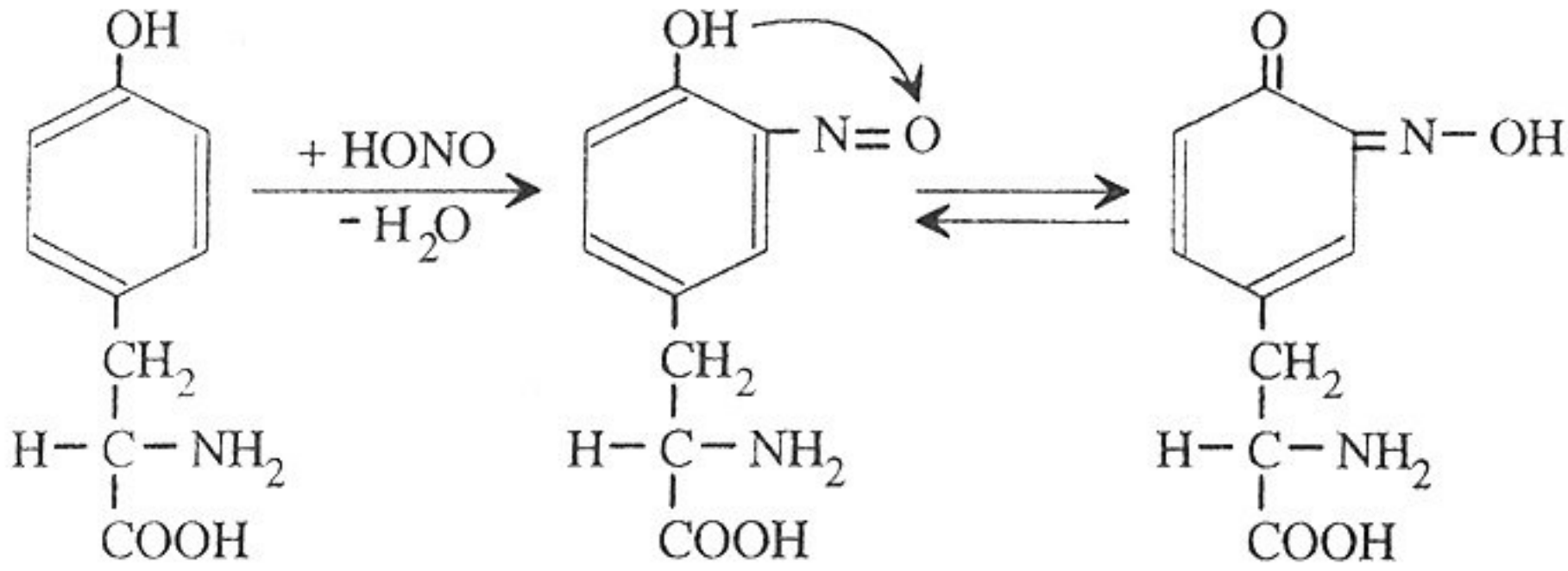
► se încălzește la fierbere până apare o coloratie galbenă;

► după răcire și alcalinizare cu NaOH 10% culoarea se intensifică și devine portocalie.

V.1.2.2. REACȚIA MILLON

Principiul reacției. Reacția Millon este caracteristică aminoacizilor ce au în structura lor un nucleu fenolic și tuturor proteinelor care au în constituția lor acești aminoacizi.

Soluția de tirozină încălzită cu ractivul Millon formează o combinație insolubilă albă, care cu timpul se colorează în roșu cărămiziu datorită formării nitrozoderivaților.



Tirozina Nitrozo derivat o-chinon oxima

Reactivi:

◆ Reactiv **Millon** - se dizolvă 5 g mercur în 10 ml HNO_3 concentrat, la rece după care se încălzește pe baie de apă; se adaugă 30 ml apă distilată după care se filtrează;

◆ Soluție de tirozină 1% sau de ovalbumină.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc 2 ml soluție de tirozină sau de ovalbumină;

► se adaugă 0,5 ml reactiv Millon;

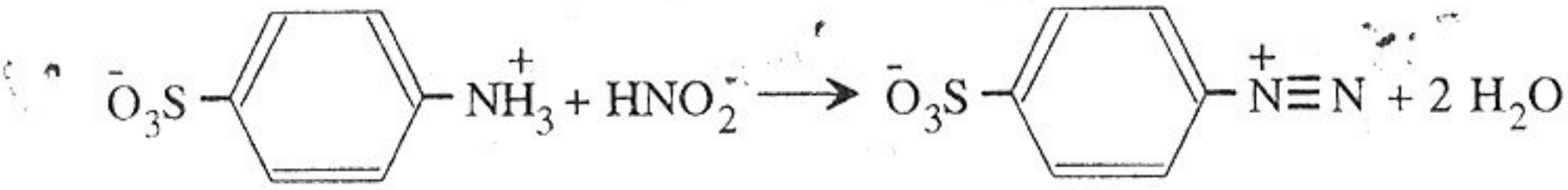
► se încălzește ușor pe baie de apă fără a depăși 50 - 60°C;

► soluția din eprubetă se va colora în roz - roșu sau va apare un precipitat roșu - cărămiziu.

V.1.2.3. REACȚIA PAULY

Principiul reacției. Anumiți aminoacizi ciclici (tirozina și, mai ales histidina) se cuplează cu săruri de diazoniu, având ca rezultat compuși **azoici** colorați.

Acidul diazobenzensulfonic se obține prin tratarea la rece a acidului sulfanilic cu acid azotos obținut din ($HCl + NaNO_2$).

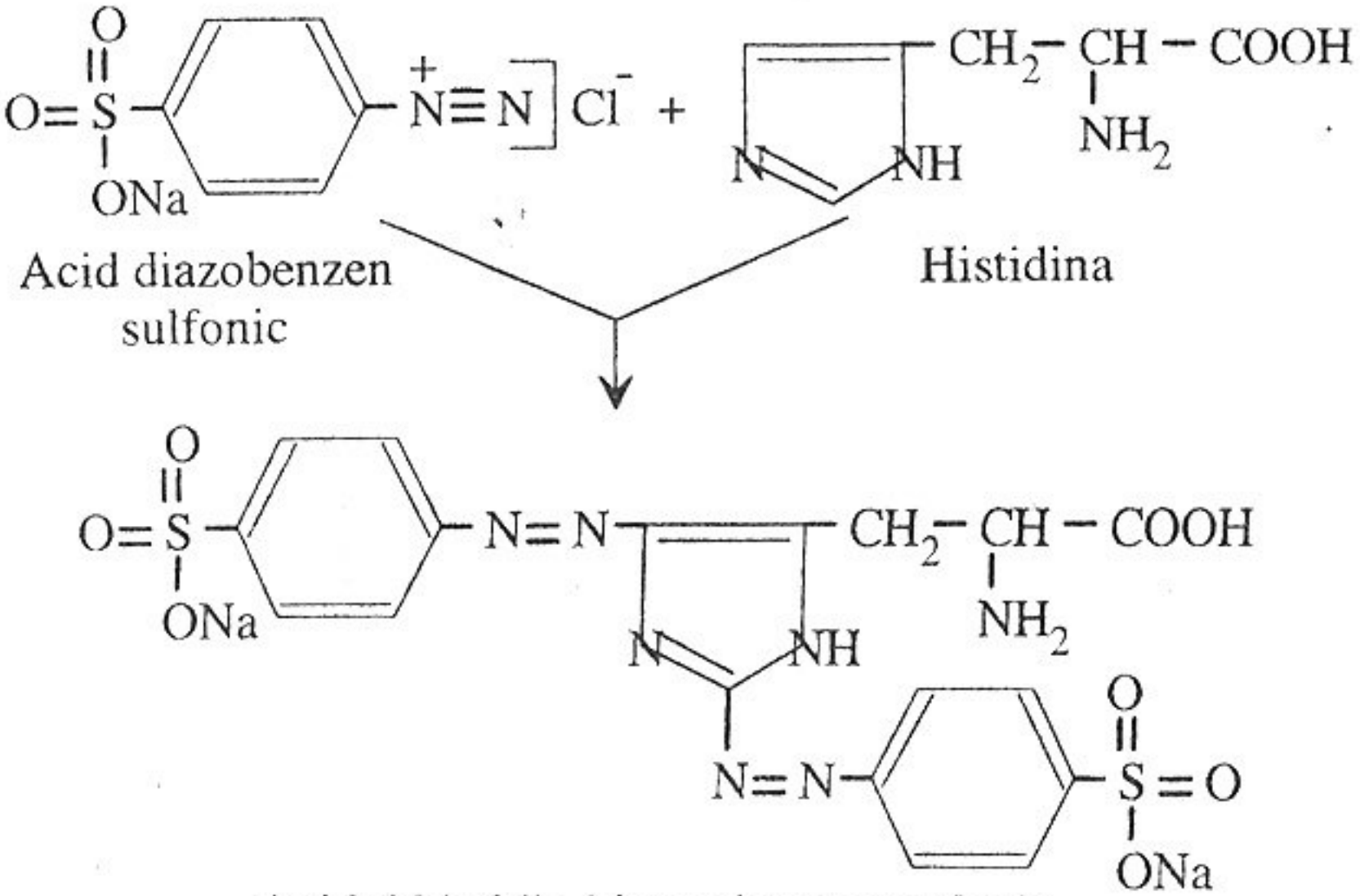


Acid sulfanilic

Acid diazobenzensulfonic

Se recomandă ca acidul diazobenzensulfonic să fie proaspăt preparat, deoarece prin păstrare se descompune.

Reacția dintre acidul diazobenzensulfonic și histidină are loc astfel:

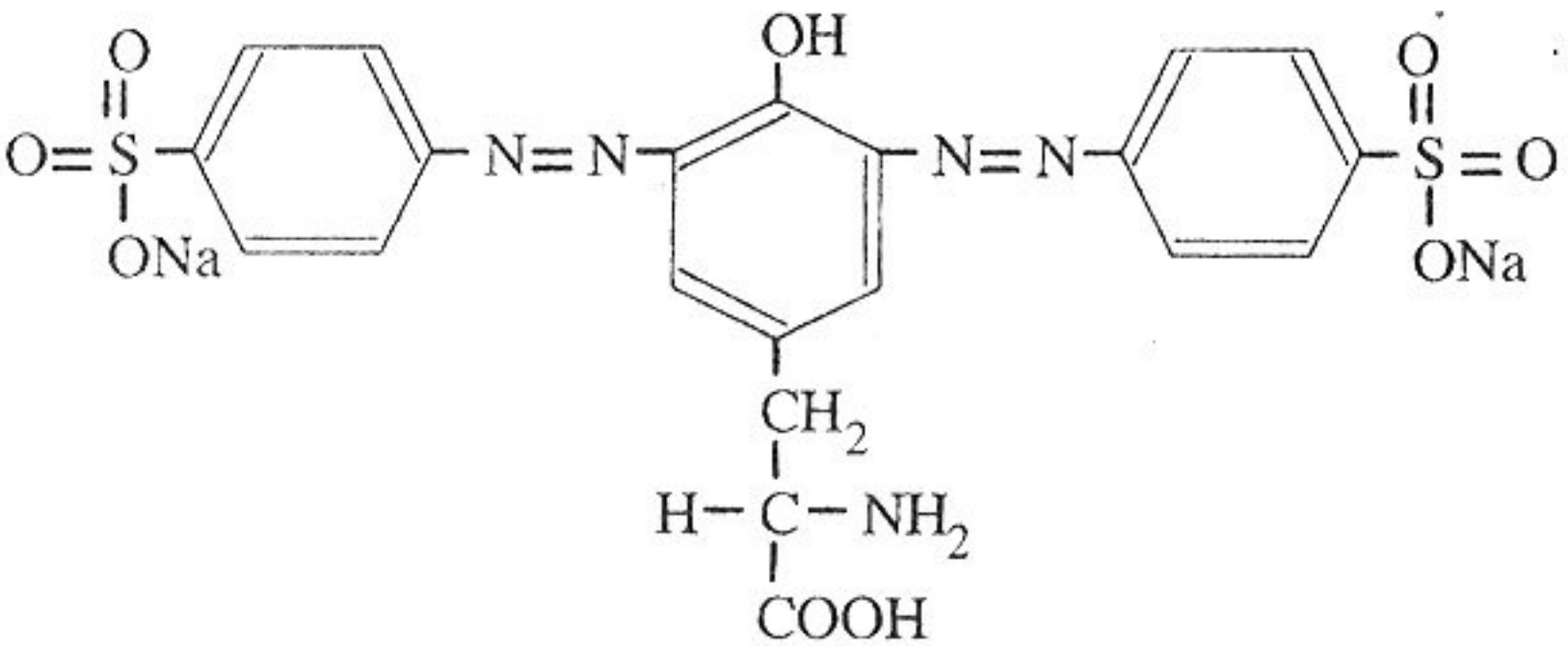


Acid diazobenzen sulfonic

Histidina

Acidul histidin bis azobenzensulfonic

Tirozina reacționează identic, având ca rezultat un derivat cu următoarea structură:



Acidul tirozin bis-azobenzensulfonic

Reacția Pauly este frecvent utilizată pentru identificarea cromatografică a histidinei și tirozinei libere și din hidrolizatele proteice.

În condițiile unei precipitări prealabile a histidinei cu acetat de mercur și clorură de sodiu, se poate doza colorimetric tirozina din hidrolizatele proteice prin metoda **Pauly**.

Reactivi:

- acid sulfanilic 0,5 g% în HCl concentrat;
- azotit de sodiu 0,5 g% în apă distilată;
- carbonat de sodiu 10%;
- soluție de histidină, tirozină sau proteină 1%.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se adaugă 2 ml soluție clorhidrică de acid sulfanilic și câteva picături de $NaNO_2$ 0,5 g%;

► se agită și după 2 - 3 minute se adaugă 1 - 2 ml soluție de aminoacid sau de proteină;

► se alcalinizează cu 4 - 5 picături de Na_2CO_3 și după o ușoară agitare conținutul eprubetei se colorează în roșu sau oranj;

► reacția are loc la temperaturi scăzute (0 - 2°C).

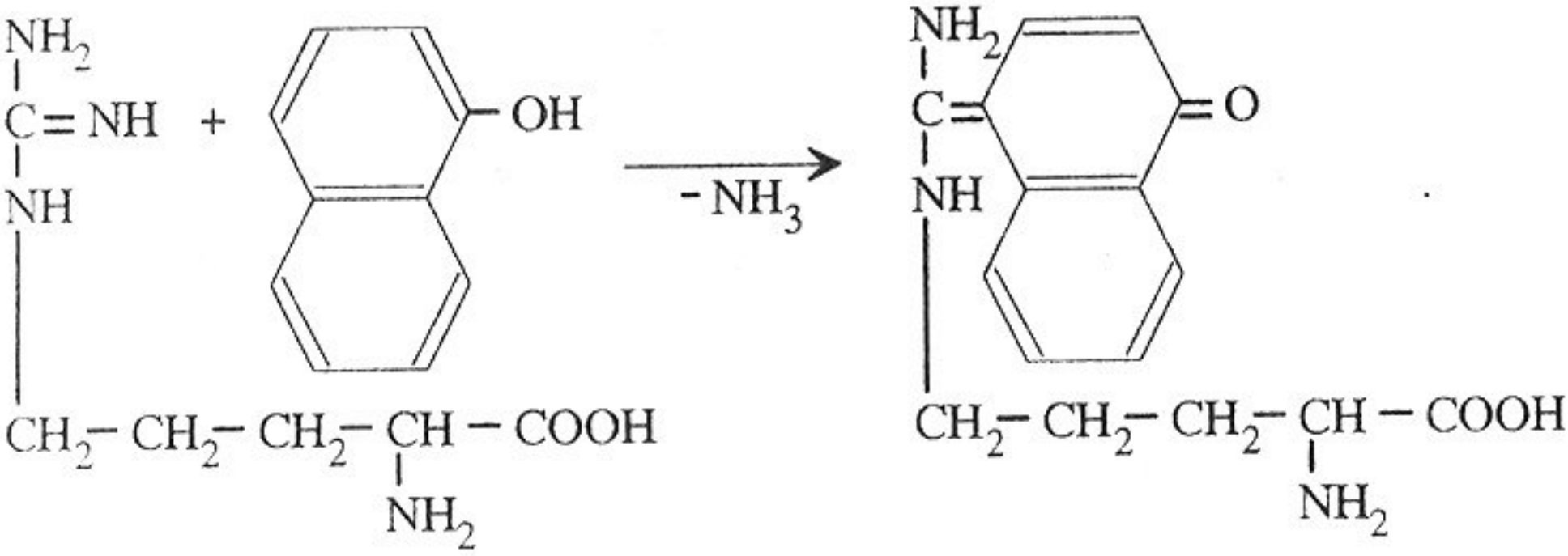
V.1.2.4. REACȚIA SAKAGUCHI - WEBER

Principiul reacției. Arginina, datorită grupării **guanidice** pe care o conține în structura sa, formează în mediu alcalin, în prezența α-naftolului sau a 8-oxi-chinoleinei și a hipobromitului de sodiu ca oxidant, un produs de condensare colorat în **roșu**. Această reacție este utilizată și pentru identificarea argininei în cromatografia pe hârtie.

Reactivi:

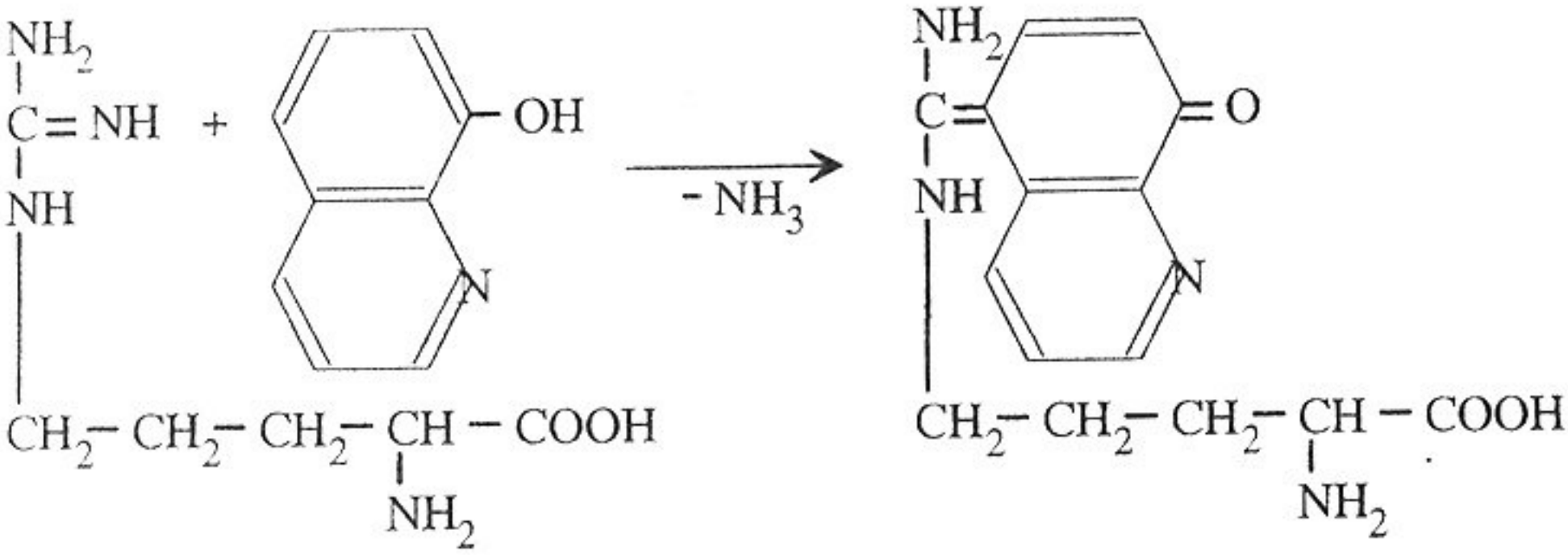
- soluție de arginină 1%, cazeină 1%, ovalbumină 1%;
- soluție alcoolică de α-naftol 2%;
- soluție de NaOBr (obținută prin tratarea a 100 ml NaOH 5% cu 2 g Br_2).

Reacția decurge după schemele de mai jos, rezultând în fiecare caz câte un complex colorat în roșu vișiniu:



Arginina

Cu 8-oxi chinoleina, reacția decurge astfel:



Arginina

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc circa 2 ml soluție arginină, cazeină sau ovalbumină;

► se adaugă 1 ml NaOH 5%;

► se adaugă 1 ml soluție α-naftol;

► se adaugă10 - 15 picături soluție NaOBr sau NaOCl;

► se obține o coloratie **roșie** a cărei formare poate fi accelerată și intensificată la cald.

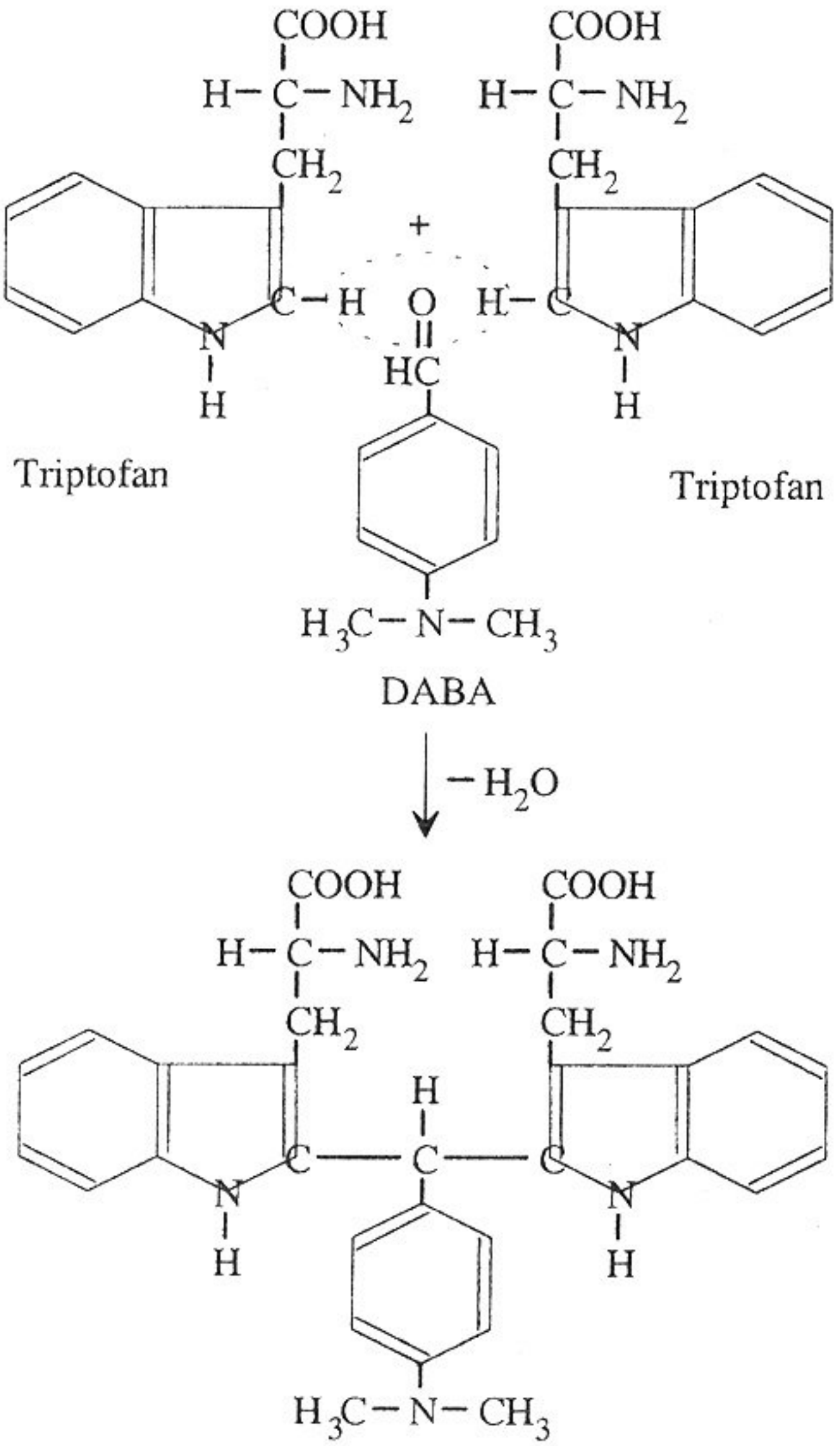
V.1.2.5. REACȚIA ADAMKIEWICZ - HOPKINS - COLE

Principiul reacției. Triptofanul, în mediu puternic acid, se condensează cu unele aldehide având ca rezultat un produs colorat.

Se utilizează frecvent următoarele aldehide:

- acidul glioxilic HOOC - CHO;
- aldehida cinamică C_6H_5 - CH = CH - CHO;
- p-dimetilaminobenzaldehida $(CH_3)_2$ - N - C_6H_4 - CHO (p=DABA);
- formaldehida (CH_2O).

Reacția triptofanului cu p-DABA decurge astfel:



Para dimetilaminobenzaldehida (p-DABA) este utilizată și în metoda de dozare a triptofanului (varianta **Lombardi**).

Reactivi:

- soluție de triptofan, caseină, ovalbumină 1%;
- acid acetic glacial (care conține acid glioxilic ca impuritate);
- H_2SO_4 concentrat;
- p-DABA 1% în HCl concentrat.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se adaugă 1 - 2 ml soluție de triptofan sau una din proteine;

► se adaugă un volum egal de acid acetic glacial sau p-DABA;

► după agitare se adaugă pe pereții eprubetei 1 - 2 ml H_2SO_4 concentrat;

► la limita de separație a celor două straturi apare un inel **albastru violet**.

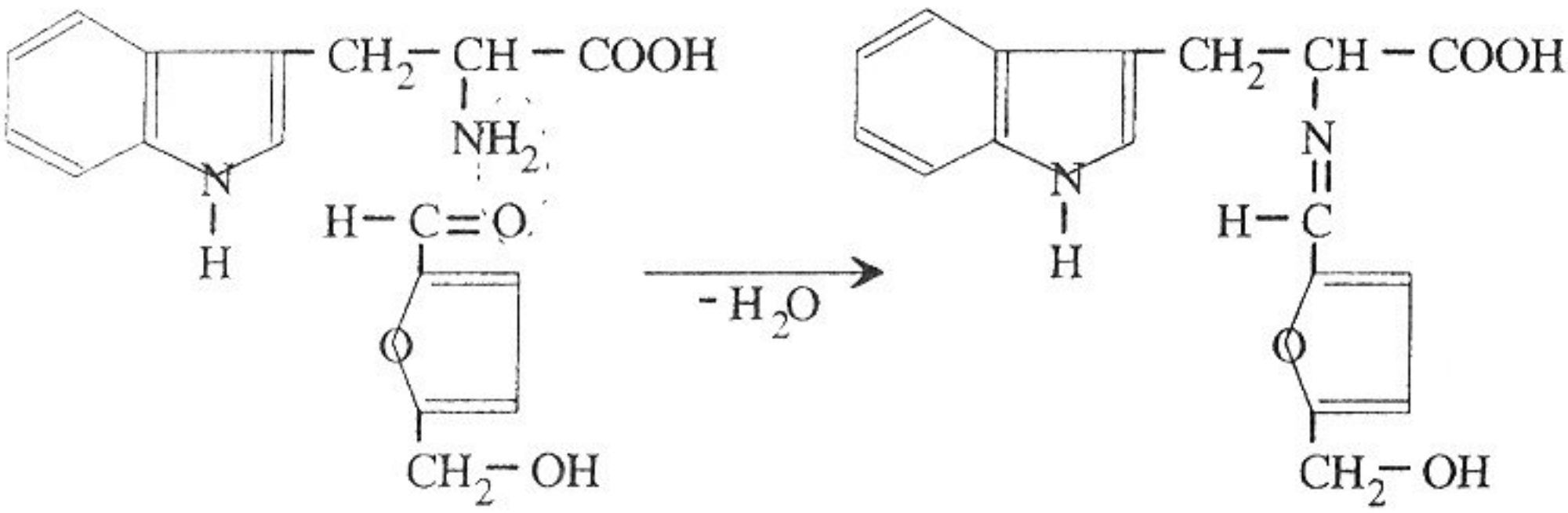
V.1.2.6. REACȚIA PETTENKOFER

Principiul reacției. Triptofanul liber sau rezultat prin hidroliza proteinelor se poate identifica prin tratare cu zaharoză sau fructoză și acid sulfuric concentrat.

Posibilitatea identificării triptofanului dintr-un lanț polipeptidic se datorește următoarelor reacții:

- hidroliza zaharozei și transformarea glucozei și fructozei rezultate în **hidroximetil furfural**;
- hidroliza parțială a proteinei cu eliberare de triptofan;
- reacția de culoare a triptofanului cu hidroximetilfurfuralul.

Reacția este utilizată și pentru identificarea **ozelor**.



Reactivi:

- soluție de triptofan 1% sau ovalbumină 1%;
- soluție zaharoză 2%;
- H_2SO_4 concentrat.

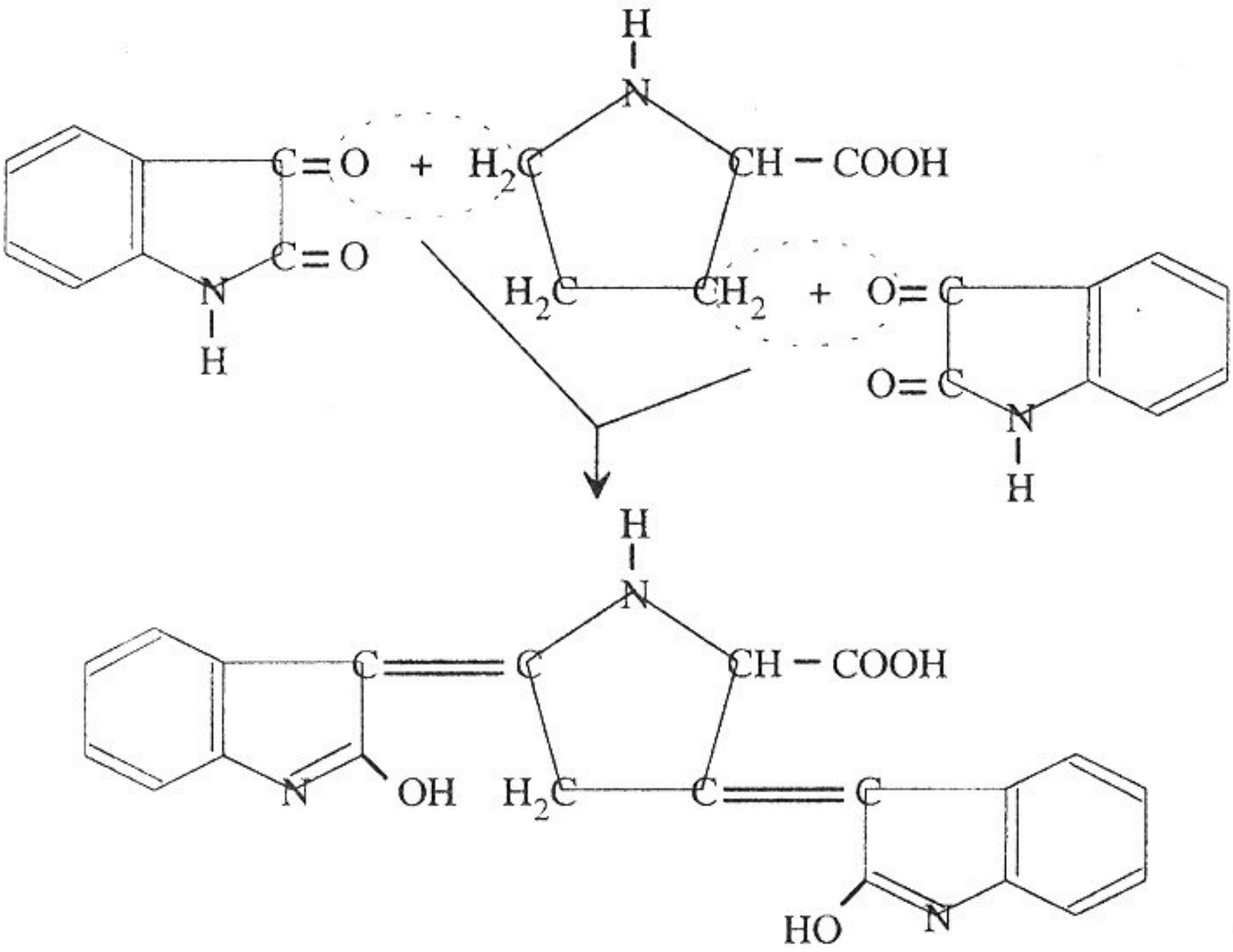
Tehnica de lucru:

- ► într-o eprubetă se introduc 2 ml soluție de proteină;
- ► se adaugă 2 - 3 picături soluție de zaharoză și se agită;
- ► se lasă să se scurgă pe pereții eprubetei cu atenție 2 ml de H_2SO_4 concentrat;
- ► la limita de separare dintre cele două soluții se formează un inel de culoare roșie care atestă prezența triptofanului.

V.1.2.7. REACȚIA CU ISATINA

Principiul reacției. Prolina și oxiprolina se condensează cu isatina dezvoltând o coloratie albastră.

Reacția are loc astfel:



Reacția este folosită atât pentru identificarea prolinei și oxiprolinei pe cromatograme, precum și pentru dozarea colorimetrică a prolinei urinare în boli de colagen.

Reactivi:

- soluție de isatină 0,4% în acetonă sau butanol;
- soluție prolină, oxiprolină 0,1% sau proteină 1%.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se adaugă circa 1 ml soluție de prolină, oxiprolină sau proteină;

► se adaugă 0,5 ml soluție de isatină;

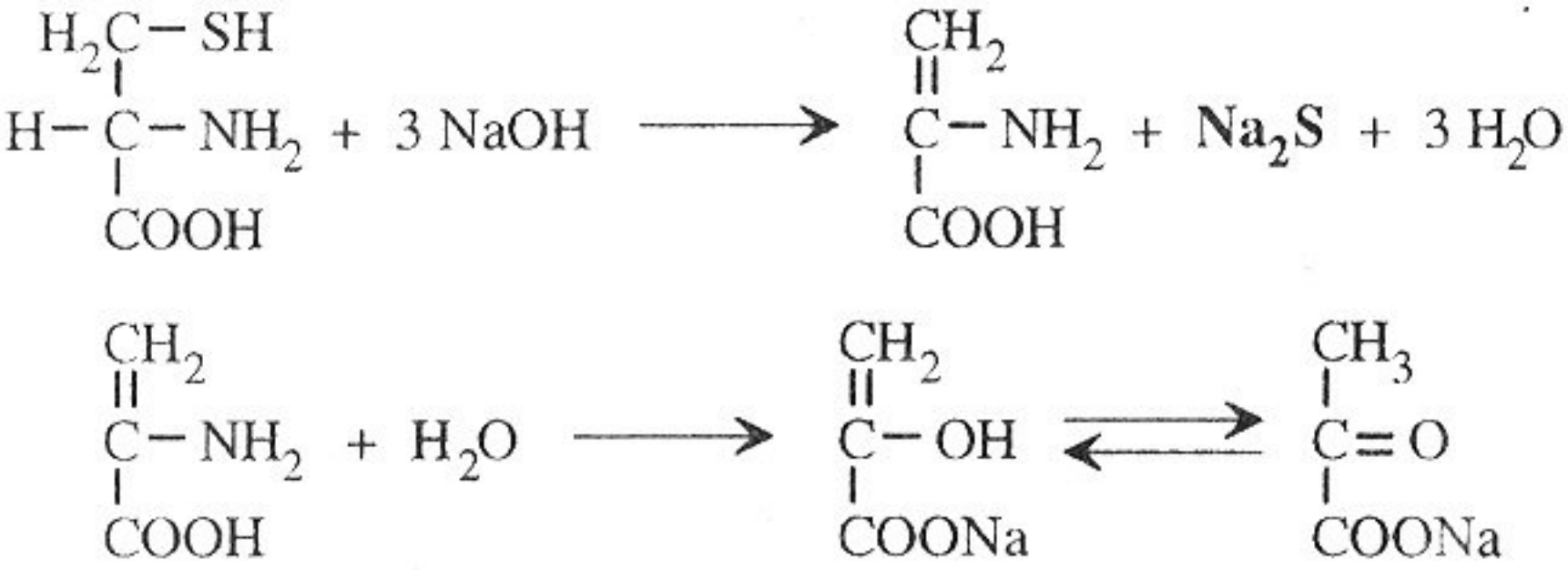
► după o ușoară încălzire se dezvoltă o coloratie **albastră**.

V.1.2.8. IDENTIFICAREA AMINOACIZILOR CU SULF

Principiul metodei. Prin încălzire în mediu puternic alcalin, sulful din tioaminoacizi (cisteină, metionină, cistina), precum și din proteinele care-i conțin, este eliberat sub formă de sulfură de sodiu.

Ionul S^{2-} este identificat cu una din următoarele reacții caracteristice: **acetat de plumb**, **nitroprusiat de sodiu**, **azotat de argint**. Cistina dă această reacție după o prealabilă reducere.

Cu cisteina reacția decurge astfel:



$$Na_2S + Pb(CH_3COO)_2 \rightarrow PbS + 2\ CH_3COONa.$$

Nitrozopentacianoferatul disodic sau **nitroprusiatul de sodiu** $Na_2[Fe^{III}(CN)_5NO]$ în soluție se colorează intens violet în prezența sulfurilor solubile, formându-se tionitrozopentacianoferatul tetrasodic conform reacției:

$$Na_2[Fe^{III}(CN)_5NO] + Na_2S \rightarrow Na_4[Fe^{III}(CN)_5NOS]$$

Azotatul de argint formează cu sulfura de sodiu un precipitat negru de sulfură de argint conform reacției:

$$2\ AgNO_3 + Na_2S \rightarrow Ag_2S + 2\ NaNO_3$$

Reactivi:

- soluție de cisteină 1% sau de ovalbumină 1%;
- soluție de NaOH 10%;
- soluție saturată de acetat de plumb;
- soluție de nitroprusiat de sodiu 1%;
- soluție de azotat de argint 1%.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc 1 - 2 ml soluție de cisteină sau ovalbumină;

► se adaugă un volum egal de soluție NaOH 10%;

► se fierbe pe baie de apă timp de 2 - 3 minute;

► se adaugă circa 2 ml soluție de acetat de plumb și se fierbe din nou;

► apare o coloratie brun neagră sau un precipitat negru de PbS;

► dacă la soluția inițială se adaugă 5 - 6 picături de nitroprusiat de sodiu apare o coloratie **violetă**;

► dacă la soluția inițială, fiartă pe baia de apă, se adaugă 1 ml soluție de $AgNO_3$ apare un precipitat **negru**.

V.2. PROTEINE

V.2.1. GENERALITĂȚI

Proteinele sunt biomolecule structurale și funcționale primordiale ale materiei vii, reprezentând substratul material al tuturor fenomenelor vieții.

Unitățile structurale de bază ale proteinelor sunt constituite din α-aminoacizi care prin condensare intermoleculară se leagă între ei cu formarea de legături peptidice (-CO-NH-), rezultând astfel catene sau lanțuri polipeptidice.

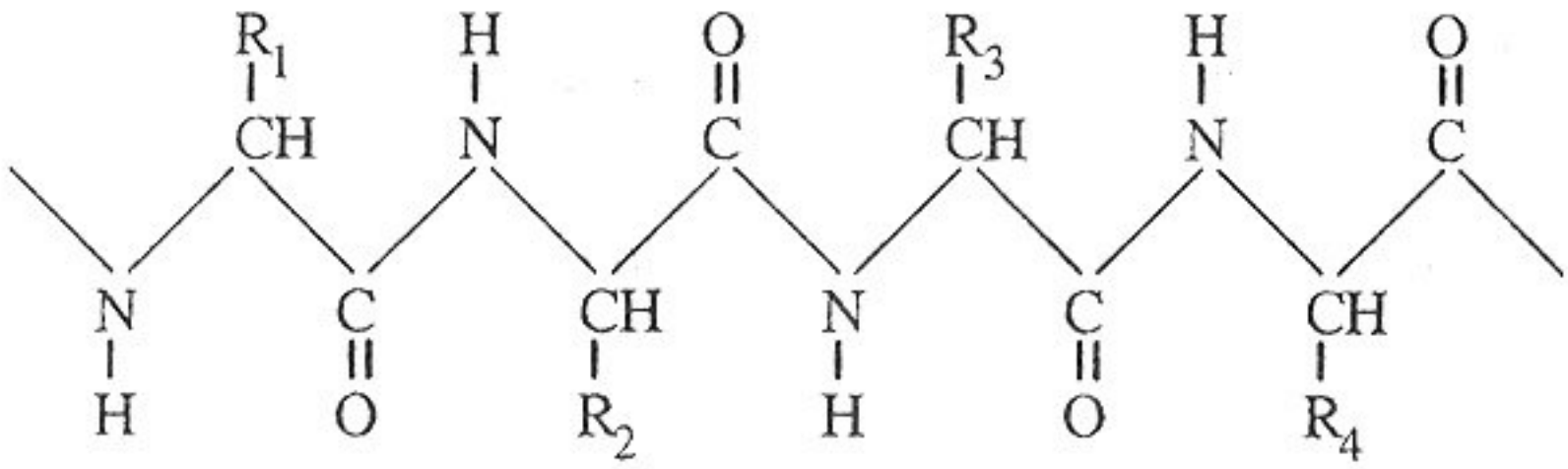


Fig.V.1 **Catenă polipeptidică**
(R_1, R_2, R_3, R_4: radicali de aminoacizi).

Proteinele sunt biomacromolecule cu structuri complexe, care prezintă mai multe tipuri de niveluri de organizare și anume: primar, secundar, terțiar și cuaternar.

În general, proteinele native există în diverse medii biologice sub formă de amestecuri complexe cu diferite grade de solubilitate.

Studiul proteinelor native implică în mod obligatoriu diferite etape analitice preliminare cum ar fi:

- **extracția** lor din celule;
- **izolarea** de celelalte proteine din mediul respectiv;
- **purificarea** cu ajutorul unor metode fizico - chimice adaptate la stadiul biologic.

Această adaptare la condițiile biologice este necesară, deoarece biomacromoleculele, evident și proteinele, sunt substanțe

labile, a căror structură poate ușor să se modifice în cursul acestor operații.

Datorită complexității structurale, precum și caracterului lor extrem de labil, obținerea unor proteine **native** cu aceeași conformație cu cea întâlnită „**in vivo**", a fost o problemă extrem de laborioasă care a implicat o ingenioasă strategie experimentală.

V.2.2. EXTRACȚIA ȘI IZOLAREA PROTEINELOR

Izolarea proteinelor **solubile** conținute în țesuturi, necesită ca o primă operație **extracția**, pentru care nu se pot preciza reguli generale, condițiile de extracție variind cu fiecare caz particular în parte.

Succesiunea aproximativă a operațiilor, în vederea extracției, este următoarea:

- mărunțirea materialului ce urmează a fi supus extracției;
- materialul mărunțit se suspendă într-o soluție tampon de un anumit pH;
- după o agitare moderată evitându-se spumarea, se ultrasonează timp de 15 minute la 10 kc sau;
- se supune omogenizării la un omogenizator de tip Potter;
- prin ambele procedee are loc distrucția celulelor, eliberându-se proteinele în soluție;
- separarea fazei lichide (care conține proteinele solubile) de materialul insolubil, operație care are loc prin **centrifugare**, realizată la temperatură scăzută și o anumită turație.

Dacă proteinele se găsesc dizolvate într-un lichid biologic: **plasmă**, **urină**, **suc digestiv**, **lichid cefalo - rahidian**, în mod evident această primă etapă este inutilă.

În vederea izolării și purificării proteinelor este prelucrat în continuare supernatantul obținut în etapele precedente.

În cursul operațiilor care preced purificarea proteinelor nu trebuie omis faptul că, în condițiile de lucru, se poate produce denaturarea acestora, care rezultă din modificări la nivelul structurii

secundare și terțiare și se manifestă, în primul rând, printr-o diminuare a solubilității.

V.2.2.1. FACTORII DENATURĂRII

Pentru evitarea procesului de denaturare a proteinelor este strict necesară cunoașterea principalilor factori care determină acest proces:

- **Temperatura**. În cursul tuturor operațiilor de extracție, izolare și purificare a proteinelor este recomandabil să se mențină temperatura la o valoare apropiată punctului de congelare al solventului în care proteinele se găsesc dizolvate (2 - 5°C).
- **pH-ul.** In general, proteinele sunt denaturate la un pH prea acid (**sub 4**) sau prea bazic (**peste 9**).

Valorile pH-ului care determină denaturarea sunt variabile de la o proteină la alta. pH-ul maxim de stabilitate este în unele cazuri în apropierea neutralității (6,5 - 7,5).

- **Solvenții nepolari.** Toți solvenții nepolari miscibili cu apa denaturează proteinele. Puterea lor denaturantă depinde de concentrația lor și de temperatură, din care cauză este important să se lucreze la o temperatură cât mai scăzută.
- **Agitarea.** Acțiunea îndelungată a acestui factor fizic asupra soluțiilor apoase de proteine, antrenează denaturarea și de aceea trebuie să se evite acest lucru.

În urma agitării și **spumării** soluțiilor proteice, **expunerea proteinelor în straturi monomoleculare** antrenează deasemenea denaturarea.

- **Factorii chimici denaturanți.** Există numeroase substanțe organice sau anorganice care pot antrena denaturări reversibile sau ireversibile ale proteinelor, asupra cărora vom reveni.

Pentru izolarea și purificarea proteinelor există o gamă de metode, alegerea lor depinzând de natura proteinei și de gradul de purificare dorit:

- precipitarea cu săruri neutre;

- precipitarea cu solvenți nepolari;
- dializa.

V.2.2.2. TEORIA PRECIPITĂRII CU SĂRURI NEUTRE

Una din cele mai utilizate metode de izolare și purificare a proteinelor este precipitarea cu săruri neutre, efect cunoscut sub denumirea de „**relargage**", în literatura franceză sau „**salting out**", în literatura engleză.

Deoarece la o anumită concentrație salină, fiecare proteină precipită, teoretic este posibil ca dintr-un amestec complex să se separe fracționat majoritatea componentelor, adăugând concentrații crescânde de săruri neutre.

Această proprietate specifică a proteinelor, de a precipita la anumite concentrații saline a servit și la o subdivizare a proteinelor serice în două mari categorii: albumine și globuline.

Solubilitatea unei proteine este condiționată de repartiția grupărilor polare hidrofile și a grupărilor nepolare hidrofobe aparținând aminoacizilor constituenți.

În cazul proteinelor globulare, datorită radicalilor hidrofili, care de obicei sunt orientați în afara lanțului polipeptidic, moleculele de apă sunt dispuse în jurul moleculelor proteice, determinând hidratarea lor. Deoarece interacțiunea dintre grupările polare și moleculele de apă este mai mare decât cea dintre lanțurile polipeptidice învecinate, se produce solubilizarea proteinelor.

Analizând variația solubilității unei proteine în funcție de creșterea concentrației unor săruri neutre, ca de exemplu **sulfatul de amoniu**, s-a constatat că, de obicei la anumite concentrații saline, are loc o creștere a solubilității.

Crescând concentrația salină peste o anumită limită solubilitatea scade, astfel ca la o anumită concentrație solubilitatea să fie minimă, deci proteina să precipite.

Datorită numărului mare de radicali hidrofili și afinității accentuate pentru apă, ionii având o tendință pronunțată de a deshidrata

îndepărtează o cantitate atât de mare de apă de pe suprafața proteinelor, încât cea care a rămas va fi insuficientă pentru menținerea proteinelor în soluție și acestea vor precipita.

Prin urmare, **precipitarea proteinelor la concentrații mari de săruri neutre se datorește deshidratării moleculei proteice de către moleculele sării adăugate.**

Procesul poate fi reversibil, deoarece la diluarea soluției cu apă precipitatul se redizolvă, ceea ce demonstrează că nu s-a produs nici o alterare a structurii proteinelor native. Această precipitare reversibilă cu săruri neutre se numește „**salifiere**".

Având în vedere capacitatea precipitantă a diferitelor substanțe, Hofmeister a stabilit **seria liotropă** care-i poartă numele în care ionul SO_4^{2-} are capacitatea maximă de precipitare.

$$SO_4^{2-} > F^- > IO_3^- > Cl^- > NO_2^- > Br^- > NO_3^- > I^- > CNS^-$$

Alegerea substanței saline neutre optime pentru precipitarea unei proteine date este condiționată de următorii factori:

- să aibă o solubilitate mare pentru a permite realizarea unei forțe ionice mari;
- să nu modifice pH-ul soluției în care se dizolvă;
- solubilitatea să nu varieze prea mult cu temperatura;
- să nu reacționeze chimic cu proteina;
- să poată fi separată ușor, atât de proteina precipitată, cât și de cea rămasă în soluție.

Îndeplinesc satisfăcător toate condițiile numai trei agenți de precipitare:

- sulfatul de amoniu $(NH_4)_2SO_4$;
- sulfatul de sodiu Na_2SO_4;
- fosfatul monopotasic+fosfatul dipotasic $KH_2PO_4+K_2HPO_4$.

Dintre aceste săruri, cel mai des utilizat este **sulfatul de amoniu**, datorită solubilității mari în apă, ceea ce permite realizarea unor forțe ionice foarte mari.

Proteina precipitată cu sulfat de amoniu, va fi apoi redizolvată într-un tampon adecvat și **dializată** la rece contra aceluiași tampon.

V.2.2.3. DIALIZA

Dializa este procesul prin care se îndepărtează moleculele mici sau ionii dintr-o soluție proteică separată de o soluție tampon dintr-un vas printr-o membrană semipermeabilă.

Particulele de dimensiuni mici vor difuza prin membrana semipermeabilă pentru a-și echilibra concentrația între soluția proteică și soluția tampon, denumită dializat. Proteinele având greutăți moleculare mari nu pot difuza prin porii membranei semipermeabile.

Procesul de dializă este un fenomen de difuzie prin membrană și se supune legilor lui Fick, exprimate prin relațiile:

$$\frac{\Delta v}{\Delta t}\Big|_{\sum} = -D \cdot s \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} \quad \text{(legea I a lui Fick)} \qquad (1)$$

$$\text{și} \quad \frac{dc}{dt}\Big| = -D\frac{d^2c}{dx^2} \quad \text{(legea a II-a a lui Fick)} \qquad (2)$$

unde: $\frac{\Delta v}{\Delta t}\Big|_{\sum}$ = fluxul molar printr-o suprafață Σ;

D = coeficientul de difuzie;

s = mărimea suprafeței;

c = concentrația substanței supusă dializei;

x = distanța dintre două puncte în sensul dializei.

În cazul în care două soluții, ce conțin aceeași substanță dizolvată, dar în concentrații diferite, sunt separate de o membrană permeabilă, la nivelul membranei se manifestă un gradient de concentrație. Acesta este datorat faptului că vitezele particulelor de substanță (ioni sau molecule) în membrană sunt mult mai mici decât în solvent (fig.V.2.).

În cazul membranelor se definește un parametru denumit **coeficient de permeabilitate** (P), prin relația:

$$P = \frac{D}{\delta} \qquad (3)$$

unde: $\delta = \Delta x$ - grosimea membranei.

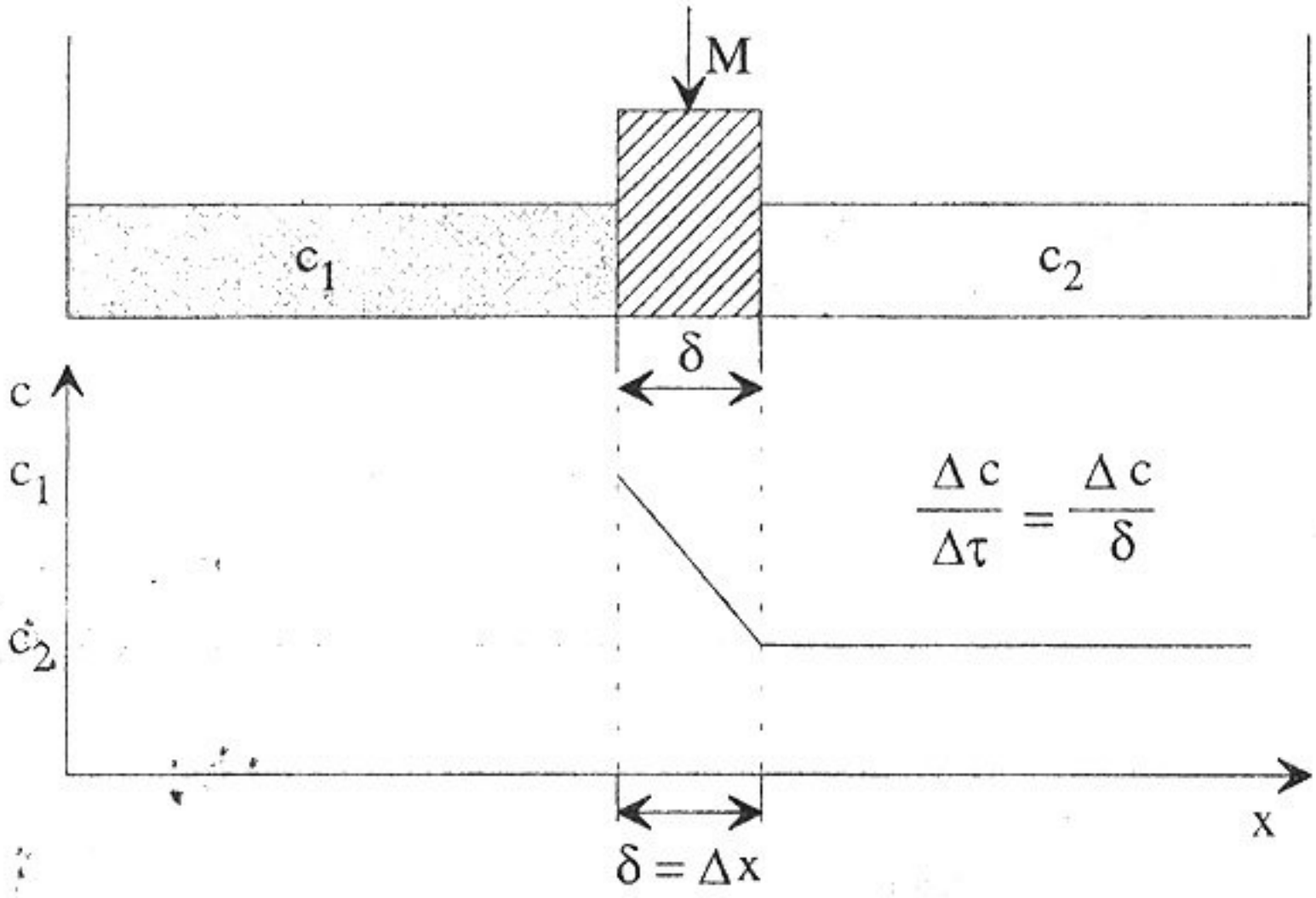


Fig.V.2$_1$ **Reprezentarea variației spațiale a concentrației unei substanțe într-un vas în care o membrană separă două compartimente în care substanța are concentrații diferite** ($c_1 > c_2$).

Pentru situația dată, legea lui Fick devine:

$$\Delta v = - P \cdot s \cdot (c_2 - c_1) \cdot \Delta t \qquad (4)$$

Relația reprezintă legea lui Fick pentru difuzia pasivă prin membrane.

În general, membranele sunt permeabile în grade diferite pentru diferiți solviți (substanțe dizolvate). Membranele permeabile pentru anumite particule și impermeabile pentru altele se numesc membrane selectiv permeabile (semipermeabile).

Aplicațiile dializei.

◆ În laborator, dializa se folosește pentru îndepărtarea ionilor sărurilor neutre folosite pentru separarea proteinelor, de exemplu ionii NH_4^+ și SO_4^{2-} rămași din $(NH_4)_2SO_4$. În acest scop se folosește un dializor pregătit ca în figura V.3.

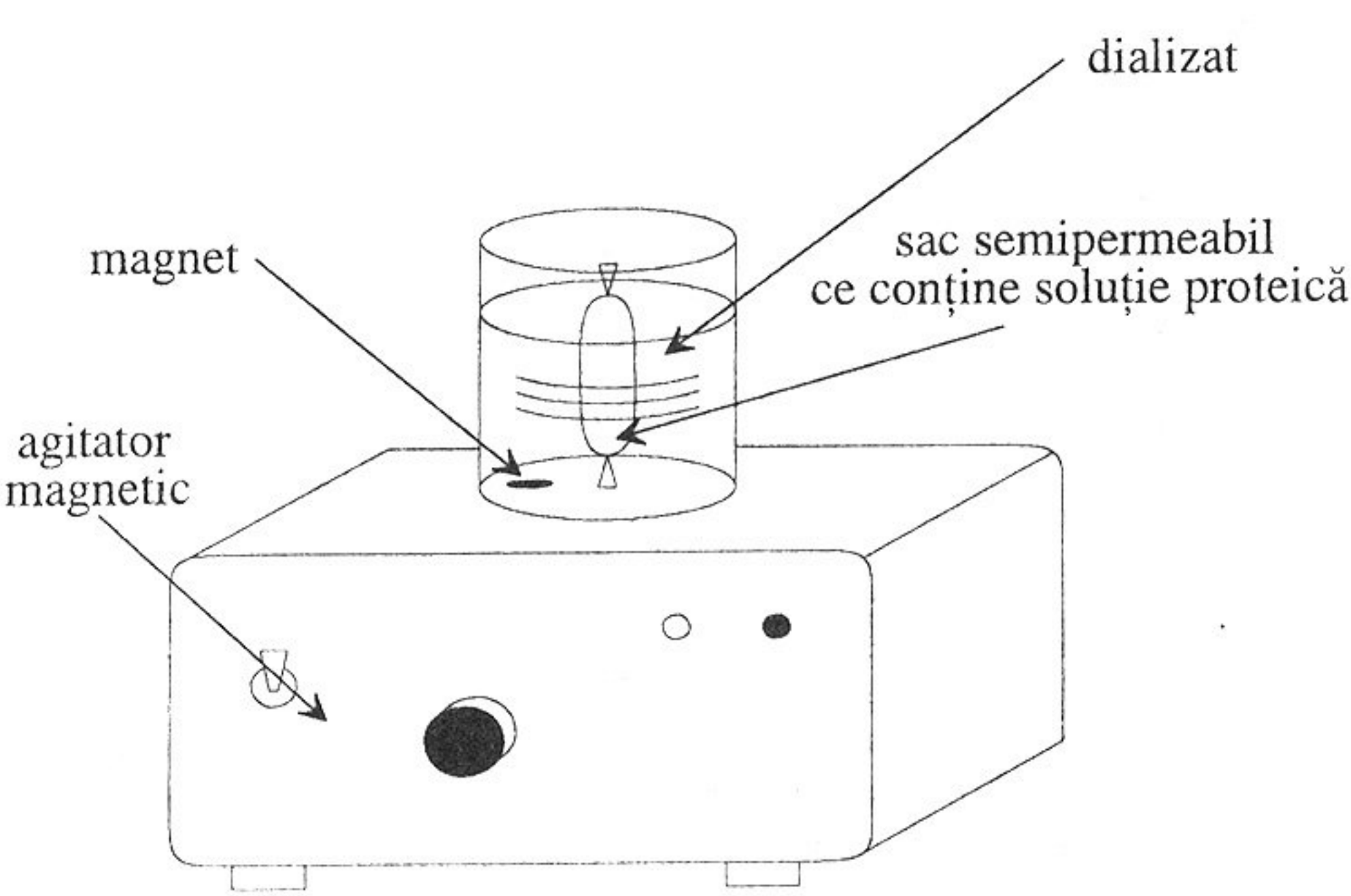


Fig.V.3. **Experiment de dializă.**

Soluția proteică ce urmează a fi dializată este introdusă într-un sac semipermeabil, iar acesta este imersat în baia de dializă. Soluția din baia de dializă este agitată ușor cu un agitator magnetic pentru a facilita echilibrul substanței ce dializează între dializat și soluția din sacul permeabil.

Operația de dializă poate fi discontinuă, când se înlocuiește în mod repetat lichidul din vasul de dializă, mai ales la începutul operației. Se poate realiza și o dializă în curent continuu folosind anumite dispozitive ce realizează umplerea și golirea continuă a vasului cu dializat.

◆ Procesul de dializă stă la baza „**rinichiului artificial**". La persoanele care au deficiențe în elaborarea urinei (insuficiență renală cronică, adenom de prostată, etc.), sângele trebuie epurat de o serie de substanțe care, acumulându-se în organism, sunt incompatibile cu viața.

Sângele intoxicat vine în contact, prin intermediul unei membrane semipermeabile de celofan sau cuprofan, cu o soluție salină cu presiunea osmotică egală cu cea a plasmei sanguine (izotonă) și se purifică.

V.2.2.4. PRECIPITAREA CU SOLVENȚI NEPOLARI

Solvenții nepolari miscibili cu apa precipită diverse proteine din soluțiile apoase. Față de precipitarea cu săruri neutre, în cazul precipitării cu solvenți nepolari intervine un nou factor și anume, **constanta dielectrică**.

Acțiunea denaturantă a solvenților se datorește în special **micșorării constantei dielectrice** a soluțiilor proteice, ceea ce are ca rezultat scăderea ionizării grupelor polare a proteinelor.

Forța electrostatică de atracție dintre două molecule proteice de același fel se exprimă prin ecuația:

$$F = \frac{e_1 \cdot e_2}{D \cdot r^2}$$, unde:

e_1, e_2 = sarcinile electrice opuse ale proteinelor;

D = constanta dielectrică a mediului;

r = distanța dintre cele două molecule învecinate.

Soluțiile **apoase**, având o constantă dielectrică mare (aproximativ 80) micșorează forța de atracție dintre sarcinile opuse ale moleculelor învecinate.

Adăugând solvenți nepolari cu o constantă dielectrică mică ($D_{\text{eter etilic}}$ = 4,1; D_{etanol} = 25; D_{metanol} = 32), constanta dielectrică a mediului scade, forța de atracție dintre moleculele proteice crește apreciabil și acestea pot să se unească formând un precipitat.

Într-un amestec care conține două proteine cu o încărcare electrică diferită, se va atinge forța de atracție limită care determină precipitarea fiecăreia în parte, la două valori diferite ale constantei dielectrice a mediului.

De aceea, crescând treptat concentrația de solvenți nepolari în amestecul proteic, acestea vor precipita pe rând, făcând posibilă separarea lor una de cealaltă.

Solvenții nepolari nu acționează numai asupra constantei dielectrice a mediului, ci intervin direct în procesele de solubilizare a

proteinelor, deoarece intră în competiție cu proteinele pentru moleculele de apă, determinând deshidratarea și deci precipitarea lor.

Deoarece solvenții nepolari au în general tendința de a denatura proteinele, toate operațiile de precipitare se efectuează la temperaturi **scăzute** (0 - 5°C), acest factor (temperatură scăzută) acționând ca un factor de protecție a proteinelor.

Solvenții nepolari utilizați la precipitare se aleg în funcție de:

- măsura în care scad constanta dielectrică a mediului;
- solubilitatea în apă (capacitatea de deshidratare a proteinelor);
- acțiunea denaturantă asupra proteinelor precipitate.

Îndeplinesc condițiile necesare: etanolul, acetona, metanolul și eterul etilic. Dintre acești agenți de precipitare, cel mai des utilizat este **etanolul**, cu toate că întrebuințarea acetonei și metanolului micșorează riscul denaturării proteinelor.

Față de precipitarea cu săruri neutre, cea cu solvenți nepolari prezintă avantajul că **exclude operația de dializă**, care este laborioasă și de lungă durată.

V.2.2.5. CRITERII DE PURITATE A PROTEINELOR

Deoarece este posibil ca în timpul operațiilor de purificare starea nativă a proteinelor să sufere anumite modificări este necesară verificarea purității lor.

Procedeele care astăzi sunt cele mai des utilizate la precizarea omogenității unei proteine sunt:

- ◆ electroforeza; ◆ cromatografia; ◆ solubilitatea;
- ◆ ultracentrifugarea; ◆ electrocromatografia;
- ◆ imunoelectroforeza.

► **Testul electroforetic** a contribuit eficient la demonstrarea eterogenității proteinelor. Au fost utilizate variante ale electroforezei în gel de amidon sau în gel de poliacrilamidă, tehnici cu o mare putere de rezoluție.

Testarea purității cu ajutorul metodei electroforetice permite detectarea unei impurități existente într-o proporție de sub 10% față de componenta majoră.

► **Diagrama de sedimentare** prin ultracentrifugare a fost considerată ca un valoros criteriu de omogenitate.

Viteza de sedimentare depinde de densitatea, dimensiunile și forma particulelor.

Soluția de proteină este supusă operației de ultracentrifugare, între 30000 - 60000 rot/min, prevăzută cu un sistem optic de fotografiere în timp a diagramei de sedimentare.

În diagrama de sedimentare impuritățile se observă;

- sub formă de **pisc** distinct de piscul principal sau
- ca un **parapet** sau **asimetrie** a piscului principal.

În anumite condiții bine stabilite de pH, temperatură și tărie ionică se pot detecta impuritățile care reprezintă 2 - 3% față de componenta majoră dintr-un preparat.

► **Testul de solubilitate** furnizează unul din cele mai bune criterii de puritate a unei proteine. Această metodă se bazează pe faptul că în condiții experimentale determinate, solubilitatea unei substanțe pure este constantă, indiferent de cantitatea de solvent adăugată.

Metoda solicită determinarea cantității de proteine dizolvate într-un volum constant de solvent tamponat, la temperatură și presiune constantă (preferabil 0 - 5°C).

Testul de solubilitate este un criteriu excelent de puritate a proteinelor, care nu necesită o aparatură specială, dar care prezintă dezavantajul folosirii unei cantități relativ mari de proteine.

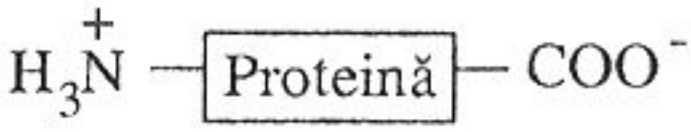
V.2.3. PROPRIETĂȚILE ELECTROCHIMICE ALE PROTEINELOR

V.2.3.1. CARACTERIZAREA PUNCTULUI IZOELECTRIC

Proteinele sunt amfoliți macromoleculari, posedând un caracter amfiionic, datorat unui număr variabil de aminoacizi neangajați

în legăturile peptidice care cuprind radicali polari disociabili cu caracter acid sau bazic. Radicalii polari aparțin:

- resturilor de aminoacizi monoaminodicarboxilici (aspartil, glutamil);
- resturilor de aminoacizi diaminomonocarboxilici (lizil, arginil).



Ca o consecință a acestui caracter amfoter, proteina respectivă va avea o sarcină electrică netă, care va depinde de pH-ul mediului. Această sarcină electrică globală a unei proteine reprezintă suma algebrică a sarcinilor pozitive și negative.

În **mediu** net **acid**, vor disocia radicalii bazici, proteina comportându-se ca un **cation**:

În **mediu** net **bazic**, molecula proteică disociază ca un acid, sarcina electrică netă a moleculei fiind negativă, proteina comportându-se ca un **anion**:

Pentru diferite proteine există **o valoare caracteristică a pH-ului pentru care disocierea ca acid a moleculei proteice este egală cu disocierea sa ca bază, proporția sarcinilor electrice pozitive (cationi) fiind astfel egală cu cea a sarcinilor electrice negative (anioni).**

Această valoare de pH poartă denumirea de **pH izoelectric** (punct izoelectric) și se notează cu **pHi**. La valori de pH < pHi, proteinele se comportă drept cationi, iar la valori de pH > pHi, proteinele se comportă ca anioni.

Punctul izoelectric reprezintă o caracteristică fizico - chimică importantă prin care o proteină se poate diferenția de altele.

Deoarece la punctul izoelectric sarcinile electrice de semn contrar se compensează între ele, unele proprietăți fizice se modifică:

► **solubilitatea proteinelor este minimă,** între solubilitatea acestora și pH-ul mediului fiind o corelație directă pe care se bazează determinarea pHi;

► **deplasarea în câmp electric** a proteinelor (electroforeza) **se anulează**, ca urmare a faptului că sarcinile electrice de semn contrar se compensează reciproc;

► deoarece proporția sarcinilor electrice pozitive este egală cu cea a sarcinilor negative, sarcina electrică globală a proteinelor devine nulă, și în consecință, macromoleculele nu se mai resping, ci manifestă tendința de agregare **precipitând** ușor;

► ca urmare a tuturor acestor efecte, se înregistrează **cea mai mică presiune osmotică** și **vâscozitate maximă**.

V.2.3.2. DETERMINAREA PUNCTULUI IZOELECTRIC AL PROTEINELOR

Principiul metodei. Cazeina - fosfoproteină care se găsește în **lapte** sub formă de sare de calciu solubilă - se introduce în soluții tampon având valori diferite de pH. Se determină pH-ul la care se constată **gradul maxim de turbiditate**, când cazeina devine insolubilă și **precipită** (pHi).

Reactivi:

◆ soluție de acetat de sodiu 0,1 n;

◆ soluție de acid acetic 0,1 n;

◆ acid acetic glacial;

◆ soluție de cazeină 0,4% care se prepară astfel: se iau 0,2 g cazeină uscată și se dizolvă în 5 ml acetat de sodiu 0,1 n;

◆ dizolvarea completă a cazeinei se realizează prin încălzirea ușoară a soluției pe o baie de apă;

◆ soluția opalescentă astfel obținută se introduce într-un balon cotat de 50 ml și se completează cu apă distilată până la cotă.

Tehnica de lucru. În 6 eprubete diferite se realizează următoarea schemă experimentală cu un interval de pH cuprins între 3,0 - 5,6 (vezi tabelul V.2.).

► după adăugarea soluției de cazeină, se agită energic fiecare eprubetă pentru omogenizare;

► se lasă eprubetele 10 minute în repaus;

► se examinează abundența precipitatului (gradul de turbiditate) în fiecare din cele 6 eprubete;

► se notează eprubeta al cărei conținut prezintă gradul maxim de turbiditate (+++);

► punctul izoelectric al cazeinei este situat în domeniul acid (4,7);

► la pHi proteinele manifestă solubilitate și stabilitate minime.

TABELUL V.2. **DETERMINAREA PUNCTULUI IZOELECTRIC AL CAZEINEI.**

Reactivi (ml)	Numărul eprubetei					
	1	2	3	4	5	6
CH_3COONa 0,1 n	2,00	2,00	2,00	2,00	0,75	0,50
CH_3COOH 0,1 n	0,25	0,50	1,00	2,00	5,25	–
CH_3COOH glacial	–	–	–	–	–	5,50
H_2O distilată	3,75	3,50	3,00	2,00	–	–
pH-ul realizat	5,6	5,3	5,0	4,7	3,5	3,0
Cazeină	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Turbiditate	–	–	+	+++	–	–

V.2.4. REACȚII DE IDENTIFICARE ȘI CARACTERIZARE A PROTEINELOR

Datorită structurii și proprietăților lor, proteinele prezintă o serie de reacții caracteristice care permit separarea și identificarea lor în diferite medii biologice și anume:

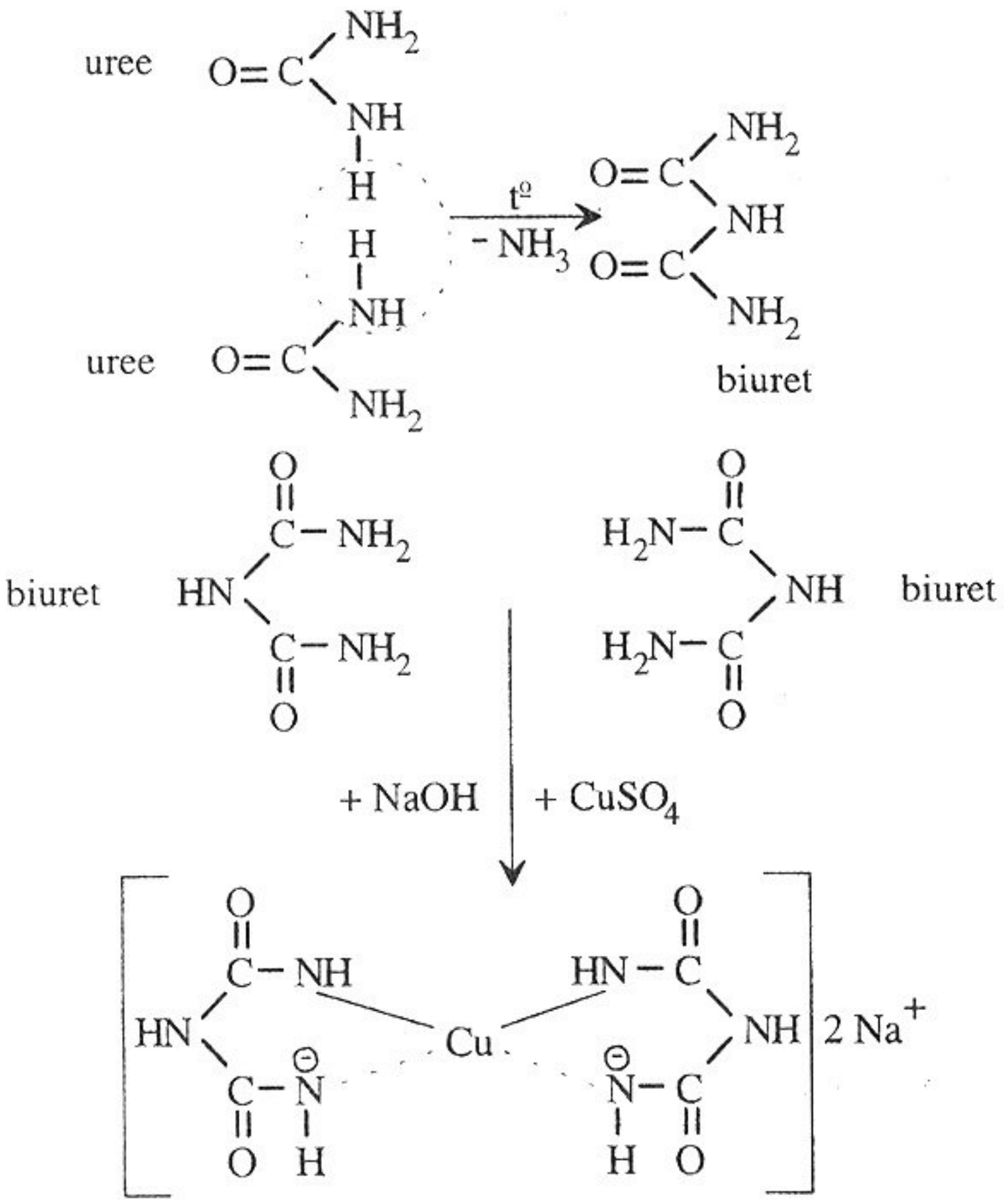
◆ reacții datorate legăturii peptidice;

◆ reacții de culoare datorate naturii radicalilor aminoacizilor din lanțul polipeptidic;

◆ reacții de precipitare.

V.2.4.1. REACȚIA BIURETULUI

Proteinele, polipeptidele și **peptidele** reacționează cu ionii de cupru (Cu^{2+}) în mediu alcalin formând un complex proteic sau peptidic cupro-alcalin, de culoare violetă. Această reacție este datorată prezenței în molecula proteinelor a legăturilor peptidice (-CO - NH -).



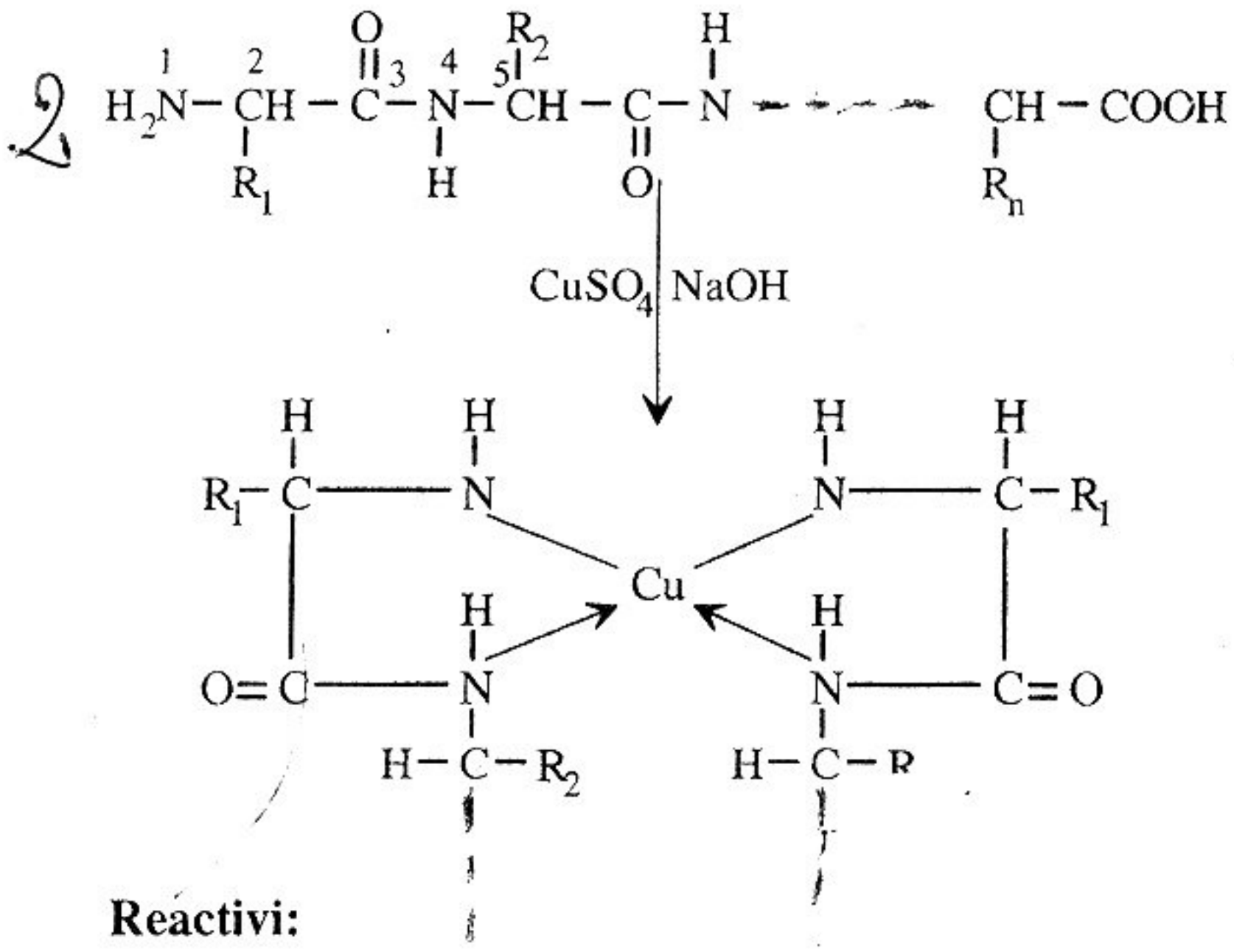
Complex cuproalcalin (culoare violetă)

Reacția poartă numele de reacția **biuretului**, deoarece cel mai simplu compus care dă această reacție este **biuretul,** compus rezultat prin condensarea la cald a două molecule de uree.

Condiția esențială ca reacția biuretului să fie **pozitivă** este legată de existența a cel puțin **două legături peptidice** în structura compușilor respectivi.

Aminoacizii, ureea, acidul uric, precum și alți compuși azotați simpli **nu interferă**.

Principiul reacției. Soluția oricărei proteine solubile, în prezența sărurilor de cupru, în mediu alcalin formează complecși chelatați de culoare roșie violetă. Reacția biuretului este utilizată și ca metodă colorimetrică pentru determinara cantitativă a proteinelor. Reacția biuretului pentru **proteine** poate fi reprezentată:



Reactivi:

- soluție de cazeină, ovalbumină 1%;
- soluție NaOH 10%;
- soluție de $CuSO_4$ 2%.

Tehnica de lucru:

- într-o eprubetă se pipetează circa 2 ml soluție proteină;
- se alcalinizează mediul prin adăugarea a circa 1 ml NaOH 10%;

► se adaugă 4 - 5 picături de $CuSO_4$ 2% și se agită;

► apare o coloraţie **violetă** de diferite nuanțe, în funcție de concentrația proteinelor.

V.2.5. REACȚII DE CULOARE ALE PROTEINELOR DATORATE AMINOACIZILOR COMPONENȚI

Aminoacizii prezenți în structura proteinelor dau reacții de culoare generale și particulare (descrise la capitolul „Aminoacizi").

În primul rând toate proteinele dau pozitivă reacția cu **ninhidrina**, o reacție generală, ca și reacția biuretului.

În al doilea rând dau pozitive reacțiile specifice diferiților radicali ai aminoacizilor din lanțul polipeptidic.

◆ reacția **xantoproteică** pentru fenilalanină și tirozină;

◆ reacția **Millon** pentru fenilalanină și tirozină;

◆ reacția **Pauly** pentru histidină și tirozină;

◆ reacțiile **Hopkins - Cole** și **Pettenkhofer** pentru triptofan;

◆ reacția cu **isatină** pentru prolină și oxiprolină;

◆ reacția cu **acetat de plumb** și **nitroprusiat de sodiu** pentru aminoacizi cu sulf.

De remarcat faptul că există anumite proteine cu manifestări contradictorii:

▪ proteinele care nu conțin resturi de aminoacizi **aromatici** (**clupeina**, **gelatina**, **salmina**) nu vor prezenta reacțiile specifice acestora;

▪ proteinele cum ar fi **caseina** și **ovalbumina,** care conțin în lanțul lor polipeptidic toată gama de aminoacizi, dau pozitive toate reacțiile, atât cele generale, cât și cele particulare.

V.2.6. REACȚII DE PRECIPITARE A PROTEINELOR

Sub acțiunea diverșilor factori **chimici**, **fizici** și **fizico - chimici**, proteinele precipită, devenind insolubile.

Reacțiile de precipitare a proteinelor pot fi de două tipuri:

- reacțiile de precipitare reversibile;
- reacțiile de precipitare ireversibile.

V.2.6.1. REACȚII DE PRECIPITARE REVERSIBILE

Proteinele existente sub formă dizolvată în soluție trec sub formă de precipitat, fără să-și modifice structura și implicit proprietățile chimice și biologice, sub acțiunea unor factori chimici. După înlăturarea agentului de precipitare reversibilă, proteinele își revin la proprietățile chimice și biologice inițiale, adică la starea lor „nativă".

În precipitarea reversibilă este afectată structura secundară a proteinelor, respectiv **legăturile de hidrogen și forțele electrostatice**.

TABELUL V.3. **PRECIPITĂRI ALE PROTEINELOR CU SĂRURI ȘI SOLVENȚI NEPOLARI.**

Soluții sau solvenți (ml)	Eprubeta							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Soluție proteină	2	2	2	2	2	2	2	2
$(NH_4)_2SO_4$	1	–	–	–	–	–	–	–
Na_2SO_4	–	1		–	–	–	–	–
$BaCl_2$	–	–	1	–	–	–	–	–
Alcool etilic	–	–	–	1	–	–	–	–
Acetonă	–	–	–	–	1	–	–	–
Cloroform	–	–	–	–	–	1	–	–
Dioxan	–	–	–	–	–	–	1	–
Butanol	–	–	–	–	–	–	–	1

Din această categorie fac parte următoarele reacții:

➢ reacții de **precipitare reversibilă** a proteinelor în prezența unor săruri solubile, proces numit **„salifiere a proteinelor"**. Grupările polare sau ionizabile rețin în jurul lor un strat de molecule de apă, prin forțe electrostatice și punți de hidrogen. Sărurile de amoniu, sodiu,

magneziu, bariu manifestă o pronunțată tendință de hidratare, acționând ca agenți de deshidratare a moleculelor de proteine care se aglomerează și astfel precipită;

➢ **precipitarea** proteinelor cu **solvenți nepolari**: alcool etilic, acetonă, cloroform, dioxan, eter etilic, etc. De remarcat faptul că precipitarea proteinelor în aceste condiții este reversibilă, numai dacă se execută la **temperaturi scăzute**, deoarece la temperatura camerei poate avea loc un început de precipitare ireversibilă.

Reactivi:

- soluție de cazeină, ovalbumină 1%;
- soluții **saturate** de $(NH_4)_2SO_4$; Na_2SO_4; $BaCl_2$;
- alcool etilic 96%, acetonă, cloroform, dioxan, butanol.

Tehnica de lucru:

► într-o serie de eprubete se pipetează aproximativ 2 ml soluție de proteină;

► se adaugă apoi 1 ml din reactivul ales pentru precipitarea proteinelor.

► după 3 - 5 minute se observă apariția unui precipitat;

► prin diluare cu apă distilată precipitatul se dizolvă.

V.2.6.2. REACȚII DE PRECIPITARE IREVERSIBILE (DENATURARE)

În reacțiile de precipitare ireversibile se produc modificări profunde în conformația și organizarea spațială a moleculelor proteice, însoțite de pierderea proprietăților fizice, chimice și biologice inițiale.

Precipitarea ireversibilă induce denaturarea acestora, deoarece după înlăturarea agentului de precipitare, proteinele își pierd solubilitatea și, în consecință, nu mai manifestă proprietatea de a trece în soluție, rămânând în stare **denaturată**.

În cazul denaturării proteinelor, acestea suferă o depliere, o dezorganizare, ca rezultat al desfacerii diferitelor legături ce stabilizează structura secundară și terțiară și, în primul rând, legăturile disulfurice.

Denaturarea ireversibilă implică trecerea de la o conformație spațială ordonată a moleculelor proteice la o stare dezordonată, însoțită de **creșterea entropiei**.

Consecințele denaturării proteinelor sunt următoarele:

- pierderea activității biologice;
- diminuarea solubilității;
- creșterea numărului de grupări - SH libere;
- pierderea capacității de a se combina cu apa;
- modificarea vâscozității și presiunii osmotice;
- creșterea susceptibilității la hidroliza enzimatică.

Agenții care provoacă denaturarea proteinelor sunt:

► **agenți fizici**: agitarea, căldura, ultrasunete, radiații bogate în energie (raze ultraviolete, raze X);

► **agenți chimici**: acizi minerali, unii acizi organici, săruri ale metalelor grele, reactivi ai alcaloizilor.

TABELUL V.4A. **REACȚII DE PRECIPITARE IREVERSIBILE.**

Reactivi (ml)	Eprubeta							
	1	2	3	4	5	6	7	8
• soluție proteină 1%	2	2	2	2	2	2	2	2
• acid azotic concentrat	1	–	–	–	–	–	–	–
• acid percloric	–	1		–	–	–	–	–
• acid clorhidric concentrat	–	–	1	–	–	–	–	–
• acid sulfuric concentrat	–	–	–	1	–	–	–	–
• acid fosfotungstic	–	–	–	–	1	–	–	–
• acid metafosforic	–	–	–	–	–	1	–	–
• acid tanic 1%	–	–	–	–	–	–	1	–
• acid tricloracetic 15%	–	–	–	–	–	–	–	1

Agenții denaturați acționează diferit asupra proteinelor:.

➢ **acizii minerali și organici** produc o precipitare, deoarece proteinele într-un mediu puternic acid se găsesc sub formă de cationi,

ceea ce determină formarea **proteinelor acide** (salifierea grupărilor bazice libere și azotului imidazolic al histidinei) concomitent cu deshidratarea parțială a moleculei proteice; excesul de acizi minerali, cu excepția acidului azotic, dizolvă precipitatul, în timp ce acizii organici adăugați în exces, nu dizolvă precipitatul proteic format;

➢ **sărurile metalelor grele** (Cu, Ag, Hg, Pb, Fe) produc precipitări ireversibile, datorită formării de săruri greu solubile ale proteinei respective;

➢ **reactivii alcaloizilor** (taninul, acidul picric, reactivul Esbach, ferocianura de potasiu, iodura mercurică) precipită proteinele, în mediu acid; aceste substanțe au o afinitate mare pentru grupările azotate din molecula proteică.

Tehnica de lucru:

► în 16 eprubete se pipetează câte 2 ml soluție de proteină;

► se adaugă în fiecare eprubetă 1 ml de reactiv menționat în tabelul de mai jos.

TABELUL V.4B. REACȚII DE PRECIPITARE IREVERSIBILE.

Reactivi (ml)	Eprubeta							
	1	2	3	4	5	6	7	8
• soluție proteină 1%	2	2	2	2	2	2	2	2
• acid picric 1,2%	1	–	–	–	–	–	–	–
• acetat de plumb 2%	–	1		–	–	–	–	–
• azotat de argint 1%	–	–	1	–	–	–	–	–
• clorură mercurică 2%	–	–	–	1	–	–	–	–
• sulfat de cupru 2%	–	–	–	–	1	–	–	–
• acid sulfosalicilic 20%	–	–	–	–	–	1	–	–
• ferocianură de potasiu 5%	–	–	–	–	–	–	1	–
• reactiv Esbach	–	–	–	–	–	–	–	1

În toate eprubetele apar precipitate abundente net vizibile.

Precipitarea termică (coagularea). Sub acțiunea căldurii, în mediu acid și în prezența unor electroliți, proteinele precipită datorită procesului de denaturare, rezultat ca urmare a dezorganizării structurii spațiale native.

Precipitarea proteinelor prin căldură este maximă la **punctul izoelectric**.

Acțiunea denaturantă a căldurii poate fi însă anulată de un mediu puternic acid sau alcalin. Într-un astfel de mediu, proteinele devin mai stabile ca urmare a modificării sarcinilor lor electrice în sensul creșterii gradului de respingere dintre molecule. În aceste condiții precipitarea nu se mai produce, proteinele menținându-se în soluție sub formă dizolvată.

Reactivi:

◆ soluție de acid acetic 10%; ◆ clorură de sodiu cristale.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc 4 - 5 ml ser diluat;

► se adaugă câteva cristale de NaCl;

► se încălzește eprubeta în flacără;

► se observă apariția unui precipitat;

► dacă se acidulează cu 4 - 5 picături de acid acetic, precipitatul nu mai apare.

Reacțiile de denaturare a proteinelor sunt curent folosite în laboratoare pentru:

- **separarea proteinelor** din extractele și lichidele biologice în care urmează să se dozeze o serie de componenți cum ar fi ozele reducătoare, produșii finali ai metabolismului proteic, elementele minerale;
- pentru oprirea reacțiilor enzimatice;
- pentru identificarea proteinelor urinare.

V.2.6.3 DEPROTEINIZAREA LICHIDELOR BIOLOGICE

Pentru separarea proteinelor din ser, plasmă, urină, extracte tisulare, etc. sunt folosite unele reacții de **denaturare**.

Această operație de îndepărtare a proteinelor, denumită **deproteinizare**, este necesară, deoarece o serie de metode de dozare a unor parametri biologici, cum ar fi de exemplu: glucidele reducătoare, produșii finali ai catabolismului proteic, electroliții, necesită utilizarea filtratelor fără proteine.

Proteinele sunt substanțe amfotere care:

- la un pH mai mic decât punctul izoelectric se manifestă ca niște cationi precipitând cu acid tricloracetic, acid percloric, acid sulfosalicilic, wolframat de sodiu;
- la un pH mai mare decât punctul izoelectric precipită cu diverși cationi Zn^{2+}, Ba^{2+}, Cd^{2+} obținându-se săruri insolubile.

Principalii deproteinizanți sunt menționați în tabelul V.5.

TABELUL V.5. PRINCIPALII DEPROTEINIZANȚI UTILIZAȚI ÎN LABORATORUL CLINIC.

Autori	Compoziție	Adecvat pentru dozarea de
▪ Greenwald	acid tricloracetic	glucoză, fosfor
▪ Folin	$Na_2SO_4 + Na_2WO_4$	acid uric
▪ Fujita - Iwatake	$CdSO_4 + H_2SO_4$	glucoză, galactoză
▪ Hagedorn - Jensen	$ZnSO_4 + NaOH$	glucoză
▪ Roe - Rice	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O + NaOH$	pentoze
▪ Folin - Wu	acid picric	creatinină
▪ Neubert	acid percloric	colesterol
▪ Rappaport	acid sulfosalicilic	colesterol

De menționat, faptul că folosirea unui agent oarecare nu determină precipitarea tuturor proteinelor, de exemplu acidul tricloracetic și acidul percloric nu precipită proteoglicanii, care sunt precipitați de acidul fosfotungstic. Din această cauză, în funcție de particularitățile metodei, se folosesc mai mulți agenți precipitanți.

Precipitatul proteic se poate îndepărta prin filtrare, dar preferabil prin **centrifugare**, deoarece acest procedeu elimină eventualele interferențe cu substanțe antrenate din hârtia de filtru.

Cei mai utilizați agenți de precipitare sunt: acidul tricloracetic, acidul percloric, acidul fosfotungstic, sulfatul de zinc, sulfatul de cadmiu, wolframatul de sodiu. Dacă în cazul acidului tricloracetic sau acidului percloric, tehnica de precipitare este simplă și constă în adăugarea unei anumite cantități de agent precipitant de o anumită concentrație, urmată de o filtrare, în cazul altor agenți tehnica de lucru este mai complicată și necesită mai multe etape, care vor fi specificate în cazul diferitelor tehnici de dozare.

V.3. GLUCIDE

V.3.1. GENERALITĂȚI

Glucidele sunt biomolecule ternare constituite din C, H și O, cu o largă răspândire atât în regnul vegetal, cât și în cel animal. Din punct de vedere structural, glucidele sunt compuși polihidroxi-carbonilici sau produși de condensare a acestora.

După criteriul gradului de hidroliză și complexitatea lor structurală, glucidele se clasifică în **oze** și **ozide**.

Ozele (monoglucide sau monozaharide) reprezintă glucide simple care nu pot fi hidrolizate sau scindate în compuși care să păstreze caracterele clasei.

Ozidele (glucide complexe) reprezintă glucide care, prin hidroliză acidă sau enzimatică, se pot scinda în oze și uneori compuși de natură neglucidică (aglicon).

După natura grupării funcționale carbonil, ozele se clasifică în: **aldoze** (polihidroxialdehide) și **cetoze** (polihidroxicetone).

Comparativ cu regnul vegetal, pentru organismul uman se întâlnesc un număr mai limitat de reprezentanți cu importanță biologică. Dintre aceștia amintim:

- **pentoze**: riboza, deoxiriboza, xiloza și arabinoza;
- **hexoze**: glucoza, manoza, galactoza, ca aldoze și fructoza, ca cetoză;

- **dizaharide**: zaharoza, maltoza, lactoza;
- **polizaharide**: glicogen și amidon.

Dat fiind faptul că ozele prezintă grupări funcționale mixte, vor manifesta proprietățile specifice ambelor grupări (carbonil și alcool).

Multe din reacțiile chimice caracteristice acestor grupări funcționale sunt utilizate pentru identificarea și diferențierea ozelor.

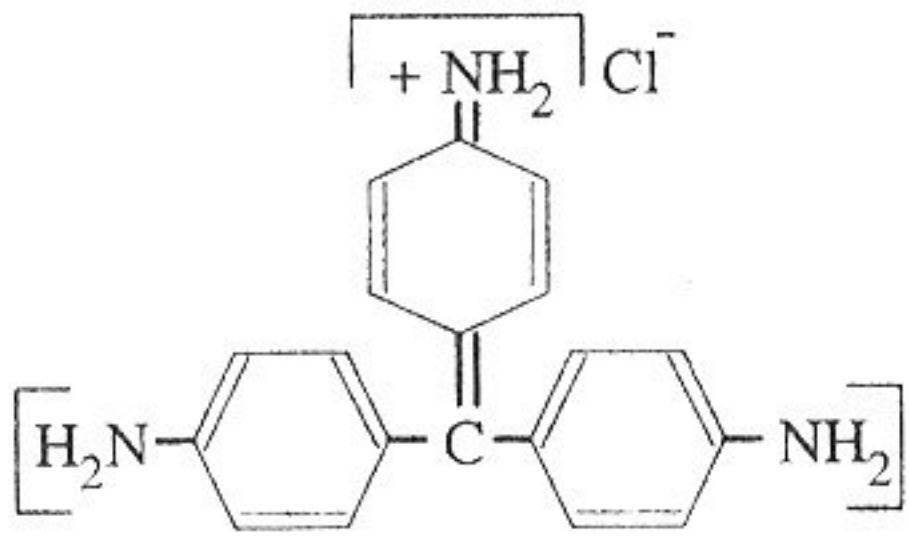
Evidențierea și diferențierea ozelor se efectuează prin:

- reacția Schiff (diferențiază ozele de aldehide);
- reacții de reducere;
- reacții de culoare;
- reacții de condensare.

V.3.2. REACȚIA DE DIFERENȚIERE A OZELOR DE ALDEHIDE.

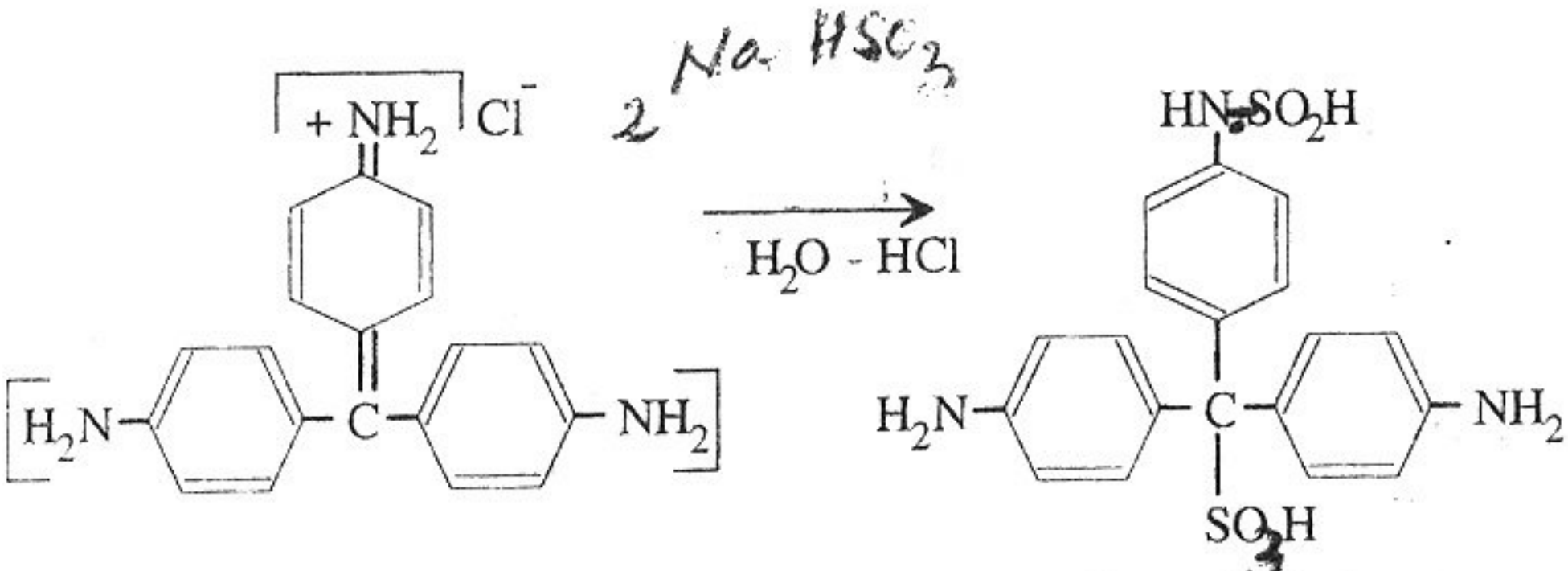
REACȚIA SCHIFF

Principiul reacției. În timp ce aldehidele dau pozitivă reacția cu leucoderivatul fucsinei, aldozele, a căror grupare carbonil este mascată sub formă de semiacetal ciclic, nu dau această reacție. Fucsina (**pararozanilina**) este un colorant roșu-violet din clasă triarilmetanului (p, p', p'' - triaminotrifenilmetan).



p, p', p'' - triaminotrifenilmetan

Soluția de fucsină tratată cu dioxid de sulf (SO_2) adiționează două molecule de acid sulfuros și se transformă în leucoderivat (leucos = alb).



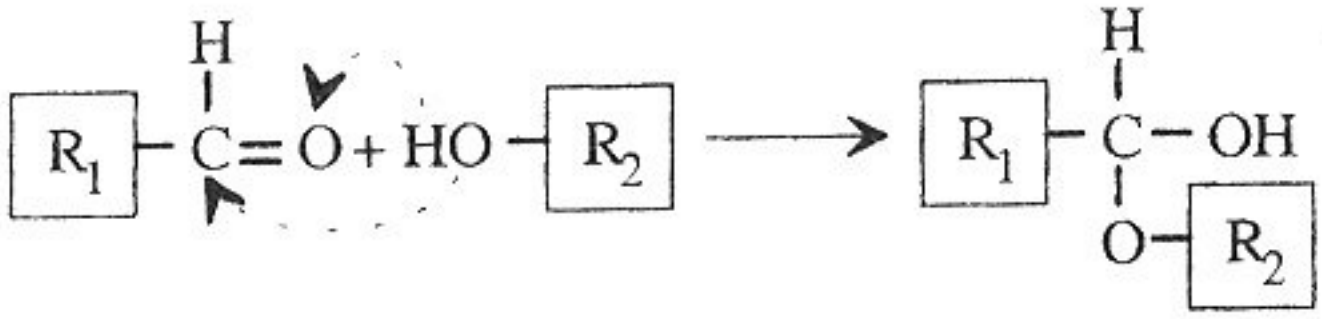
Fucsina

Leucoderivat

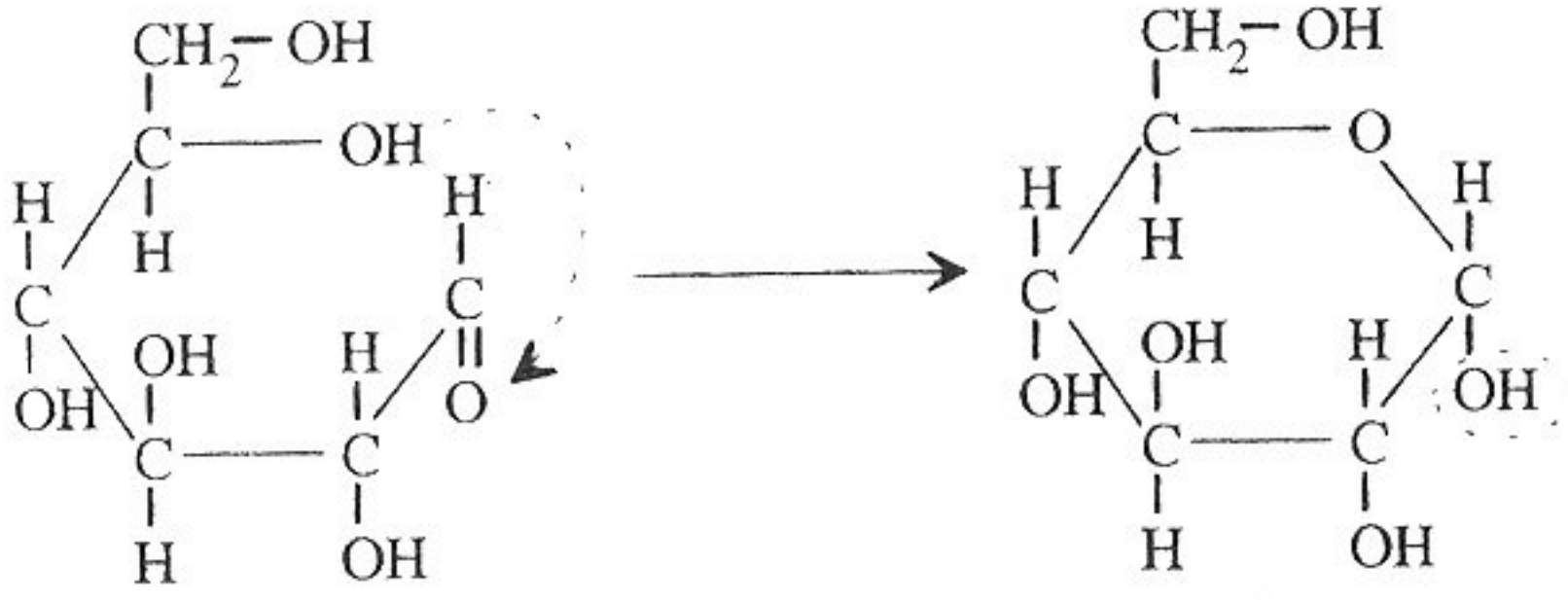
În prezența aldehidelor, leucoderivatul fucsinei (reactivul Schiff) se recolorează, dar glucoza și, în general aldozele, nu vor recolora reactivul Schiff.

Motivul pentru care hexozele nu dau reacția cu reactivul Schiff pozitivă, este faptul că acestea, în soluție apoasă, se găsesc într-o proporție de 99,90% sub formă ciclică.

Acest proces de ciclizare rezultă în urma formării unui semiacetal prin reacția dintre o aldehidă și un echivalent de alcool:



În cazul concret al glucozei are loc o reacție de ciclizare intramoleculară.



Cu alte cuvinte, gruparea aldehidică este **mascată**, iar hidroxilul semiacetalic format preia o parte din caracteristicile sale.

Reactivi:

◆ reactiv Schiff:

- soluție apoasă de fucsină 1% 70 ml;
- soluție 28% de bisulfit de sodiu 20 ml.

După o oră se adaugă 10 ml HCl concentrat. Reactivul se folosește după 48 ore.

◆ soluție de glucoză 2%; ◆ soluție de aldehidă formică 5%.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc 2 ml din soluția de **aldehidă formică,** iar în alta 2 ml din soluția de **glucoză**;

► în ambele eprubete se introduc câte 0,5 ml reactiv Schiff;

► soluția din eprubeta ce conține aldehida formică se va recolora;

► soluția din eprubeta ce conține glucoză va rămâne incoloră.

V.3.3. REACȚII CARE PUN ÎN EVIDENȚĂ CARACTERUL REDUCĂTOR AL GLUCIDELOR

Datorită existenței în molecula lor a grupării funcționale aldehidă, ozele manifestă proprietăți reducătoare. Dizaharidele care conțin funcțiunea carbonil liberă, respectiv hidroxilul semiacetalic, prezintă proprietăți reducătoare.

În decursul timpului au fost precizate numeroase reacții care pun în evidență caracterul reducător al ozelor, dintre care unele sunt mult utilizate în laboratoarele clinice pentru a constata prezența sau lipsa ozelor în urină, mai ales a glucozei. În principiu, reacțiile au loc prin transformarea glucozei în acid gluconic și rezultă un precipitat de Cu_2O de culoare roșie cărămizie, se depune o **oglindă de argint** sau un **precipitat de bismut**.

În scopul evidențierii acestei proprietăți se folosesc reacțiile menționate în tabelul V.6.

TABELUL V.6. REACȚII CARE PUN ÎN EVIDENȚĂ CARACTERUL REDUCĂTOR AL GLUCIDELOR.

Denumirea reacției	Reactivul utilizat	Produsul reacției
◆ Fehling	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + sare Seignette	Cu_2O
◆ Trommer	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Cu_2O
◆ Benedict	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + citrat de sodiu	Cu_2O
◆ Barfoed	$Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$	$Cu_2O \cdot$
◆ Tollens	$[Ag(NH_3)_2]OH$	Ag
◆ Nylander	$Bi(OH)_2NO_3$	Bi
◆ Acid picric	Acid picric	Acid picramic

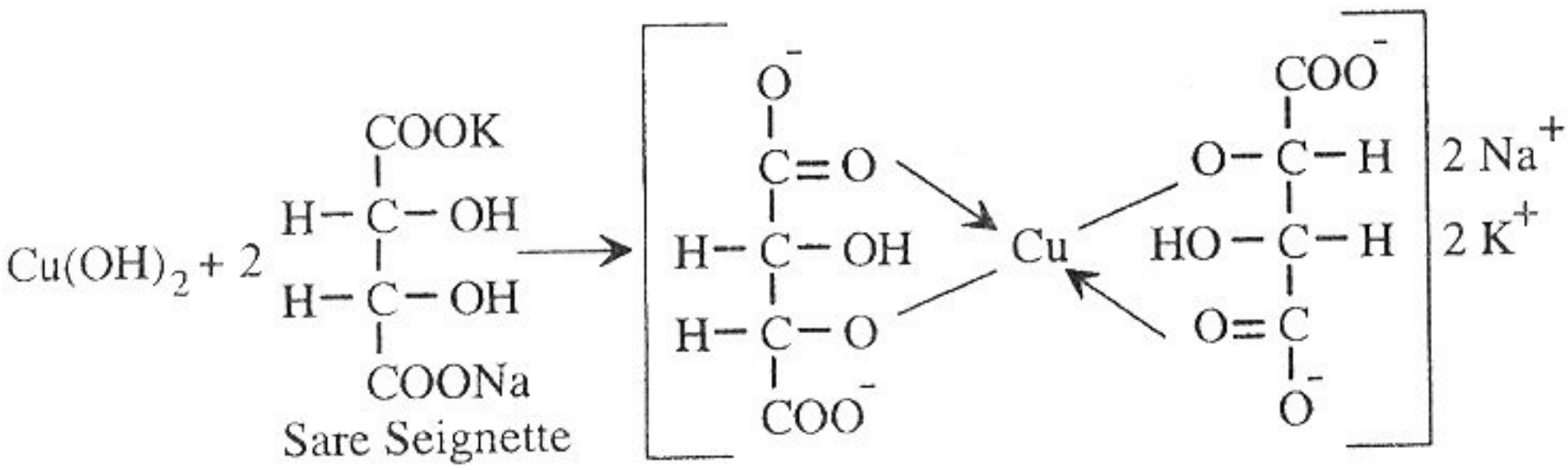
V.3.3.1. REACȚIA FEHLING

Principiul reacției. Aldozele, în mediu alcalin și la cald, reduc ionii de cupru divalent Cu^{2+} (de culoare **albastră**) la ioni de cupru monovalent (Cu^+), cu formare de oxid cupros de culoare **roșu - cărămiziu**. Reacția decurge în mai multe etape:

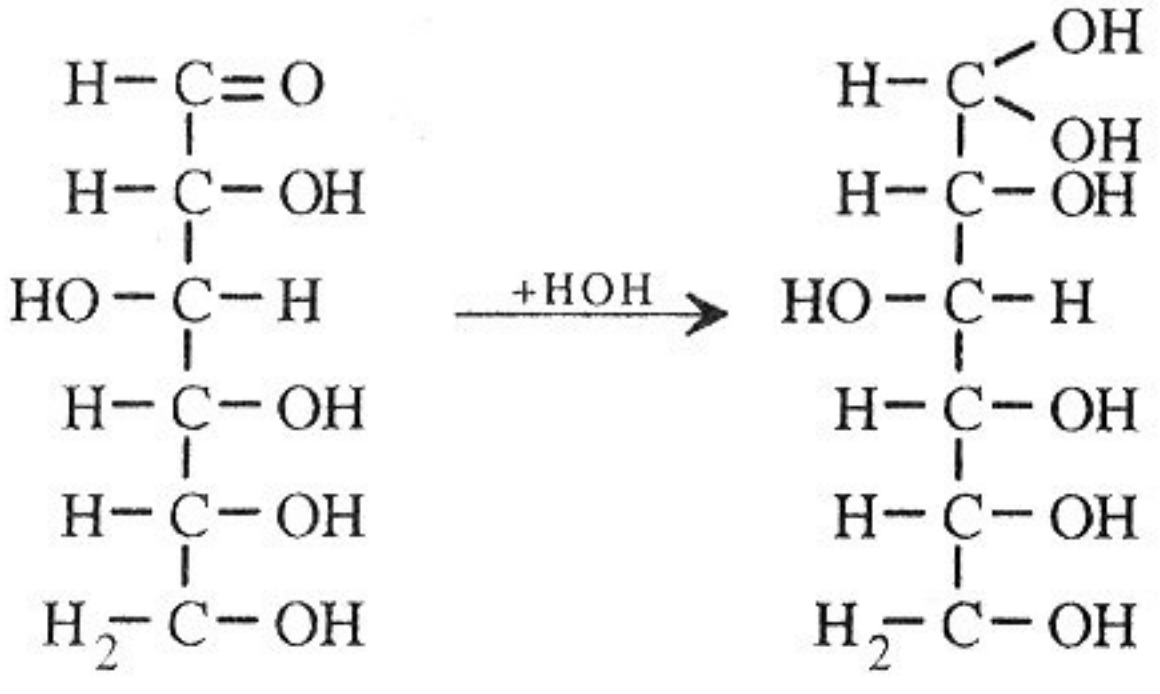
➢ sulfatul de cupru reacționează cu hidroxidul de sodiu formând hidroxid cupric și sulfat de sodiu:

$$CuSO_4 + 2\ NaOH \rightarrow Na_2SO_4 + Cu(OH)_2;$$

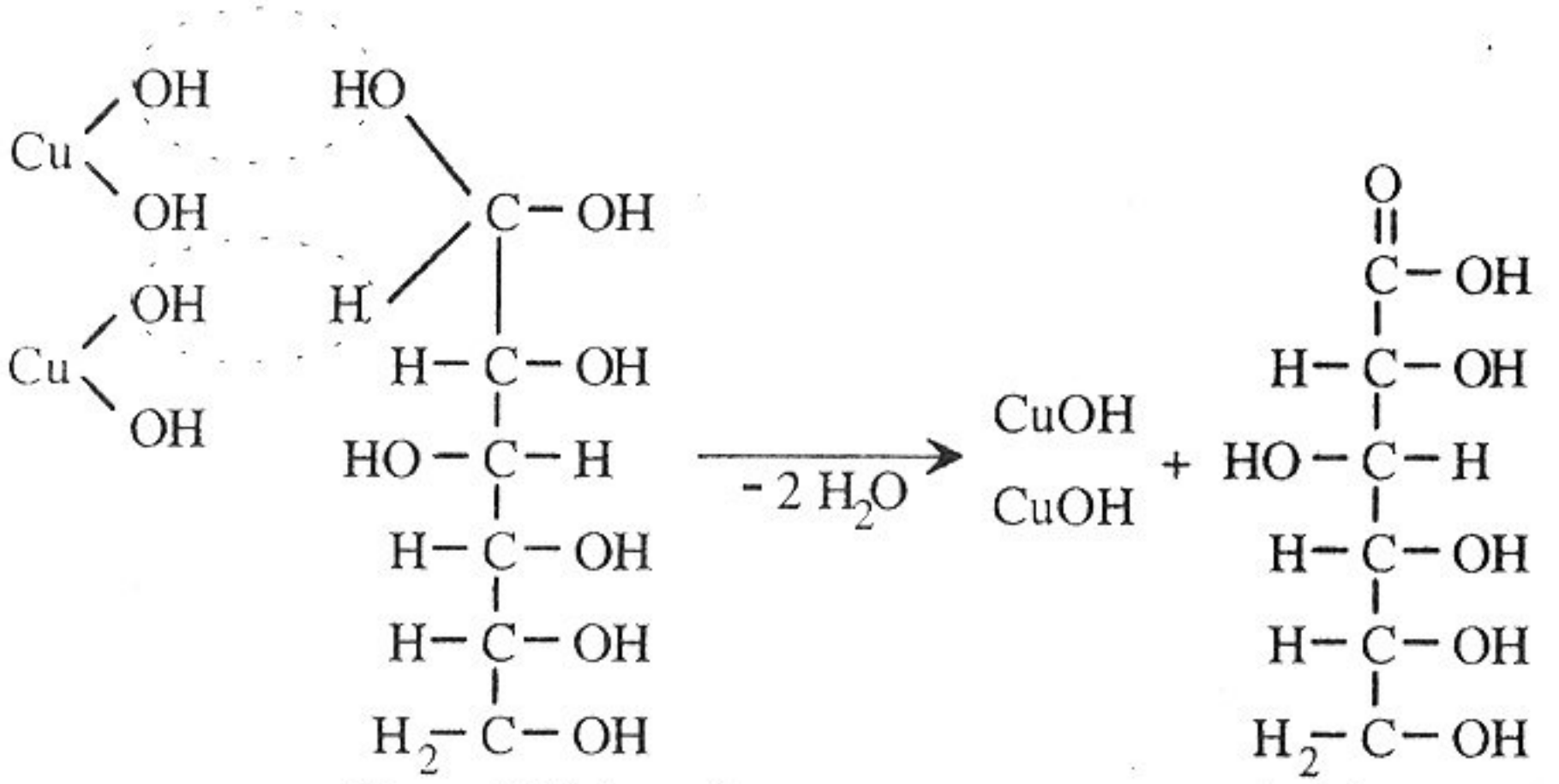
➢ hidroxidul cupric - precipitat albastru gelatinos - se dizolvă în soluția de tartrat de sodiu și potasiu (reactiv Fehling II - sare Seignette) cu formarea unei combinații complexe de culoare albastră intensă:



➢ complexul format cu sarea Seignette, eliberează treptat hidroxidul cupric care este redus de către glucoză în formă hidratată:

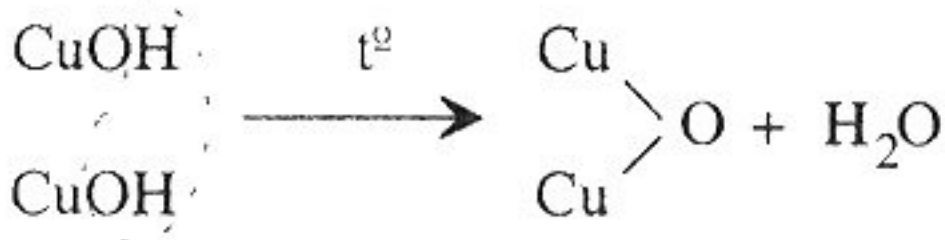


Glucoză Glucoză hidratată

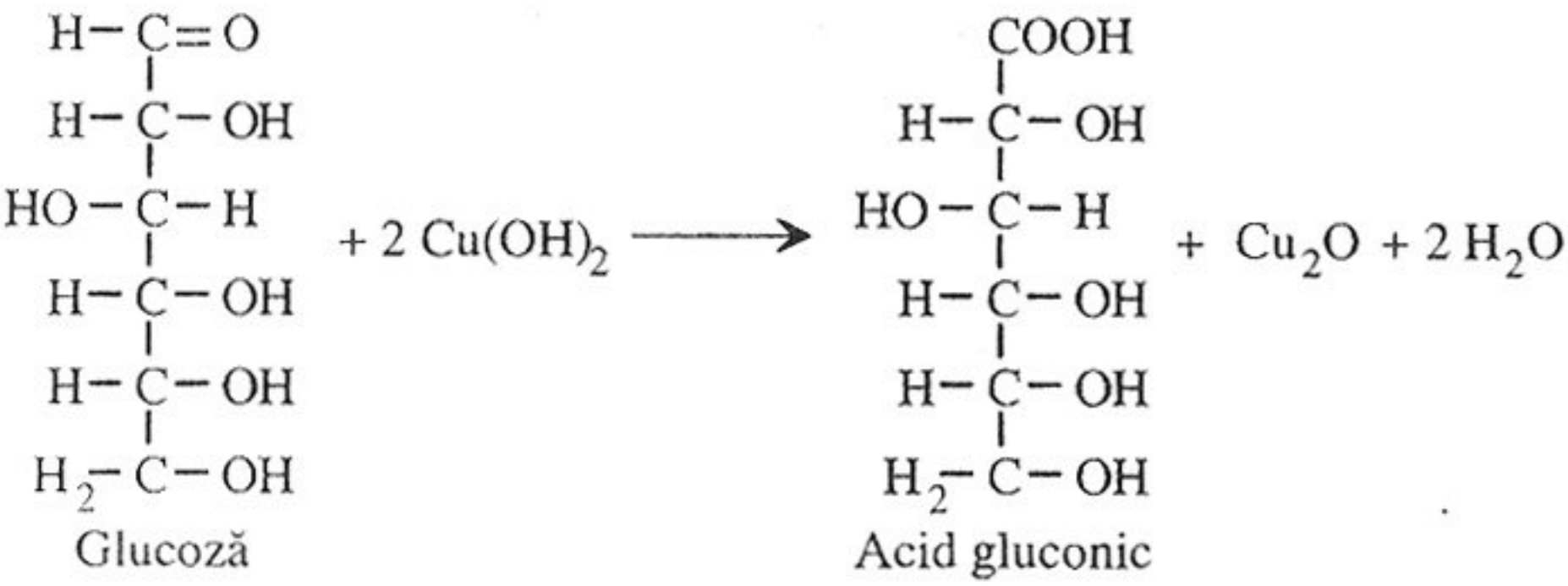


Glucoză hidratată Acid gluconic

➢ hidroxidul cupros prin **încălzire**, pierde o moleculă de apă formând oxid cupros de culoare roșie cărămizie:



➢ reacția totală poate fi scrisă și astfel:



Glucoză Acid gluconic

➢ excesul de $Cu(OH)_2$ poate masca reacția, deoarece în timpul încălzirii pierde o moleculă de apă, având ca rezultat oxidul cupric de culoare **neagră**:

$$Cu(OH)_2 \rightarrow CuO + H_2O$$

➢ acest incovenient este evitat prin utilizarea de reactivi, cum ar fi: tartratul de Na și K și citratul de sodiu.

Reactivi:

◆ reactivul **Fehling** este format prin amestecarea a două soluții și anume:

▪ **reactiv Fehling I**: 40 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ se dizolvă în apă distilată, peste care se adaugă 2 ml H_2SO_4 concentrat și se completează la 1000 ml cu apă distilată;

▪ **reactiv Fehling II**: 346 g de tartrat de sodiu și potasiu (sare Seignette) și 140 g NaOH se dizolvă în apă distilată prin încălzire pe o baie de apă; după răcire se completează cu apă distilată la 1000 ml;

Reactivii se păstrează separat și se amestecă în momentul folosirii.

◆ soluții 1% de glucoză, fructoză, arabinoză, maltoză, zaharoză și amidon.

Tehnica de lucru:

► în mai multe eprubete se pipetează 1 - 2 ml din glucidele enumerate mai sus;

► se adaugă un volum egal de reactiv Fehling (proaspăt preparat prin amestecarea în proporții egale a soluției Fehling I + Fehling II);

► conținutul eprubetelor se încălzește 1 - 2 minute pe flacără sau baie de apă;

► apariția unui precipitat roșu cărămiziu evidențiază prezența unui glucid reducător.

► glucoza, arabinoza și maltoza vor prezenta reacție pozitivă în timp ce fructoza, zaharoza și amidonul nu.

V.3.3.2. REACȚIA TROMMER

Principiul reacției este identic cu cel descris la reacția Fehling.

Reactivi:

◆ soluții 1% de glucoză, lactoză, zaharoză, amidon;

◆ hidroxid de sodiu 10%; ◆ sulfat de cupru 2%.

Tehnica de lucru:

► în patru eprubete se pipetează 1 - 2 ml din soluțiile de glucide enumerate mai sus;

► în fiecare eprubetă se adaugă un volum egal din soluția de NaOH 10%;

► dintr-o sticlă picurătoare se adaugă soluție de sulfat de cupru, până la apariția unei suspensii de hidroxid cupric de culoare albastră;

► partea superioară a soluției se încălzește cu grijă la flacăra unui bec de gaz;

► apare o culoare **galbenă**;

► dacă se încălzește în continuare, conținutul eprubetei trece în **roșu - cărămiziu**, evidențiind prezența glucidelor reducătoare.

V.3.3.3. REACȚIA BENEDICT

Principiul reacției este identic cu cel al reacției Fehling, cu deosebirea că în locul sării Seignette, reactivul conține citrat de potasiu.

Reactivul Benedict este mai stabil decât reactivul Fehling și prezintă avantajul unei sensibilități mai ridicate.

Reactivi:

◆ reactivul Benedict se prepară astfel:

1. ■ citrat de potasiu 85 g;
   ■ carbonat de sodiu anhidru 50 g;
   ■ apă distilată 400 ml;

2. ■ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 8,5 g;
   ■ apă distilată 50 ml;

Aceste două soluții se amestecă cu agitare energică și dacă amestecul nu este limpede se filtrează.

◆ soluții de glucoză, arabinoză, lactoză, zaharoză și amidon 1%.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc 2 - 5 ml reactiv Benedict;

► se adaugă 5 - 6 picături din soluția unui glucid;

► amestecul se încălzește la fierbere timp de 5 minute în baia de apă;

► în prezența glucidelor reducătoare apare un precipitat **verzui**, **galben** sau **roșu** în funcție de concentrația glucidului:

- opalescență verde - până la 1 g glucoză %;
- precipitat galben - 10 - 20 g glucoză %;
- precipitat roșu - peste 25 g glucoză %.

V.3.3.4. REACȚIA BARFOED

Principiul reacției. Reacția Barfoed, spre deosebire de celelalte reacții Fehling, Trommer, Benedict, se caracterizează prin faptul că oxidarea grupării aldehidice a glucidelor se realizează într-o soluție al cărei pH este apropiat de mediul neutru.

În aceste condiții experimentale, dizaharidele reducătoare (maltoza, lactoza) **nu sunt oxidate**. Reacția devine **pozitivă** dacă soluția se încălzește timp de 10 minute pe baia de apă, în care caz dizaharidele sunt **hidrolizate**.

În condiții de lucru similare, reacția Barfoed permite o diferențiere între **monozaharide** și **dizaharidele reducătoare.**

Reactivi:

◆ reactivul Barfoed se obține dizolvând 13,5 g acetat de cupru neutru cristalizat $Cu(CH_3\text{-}COO)_2 \cdot 2H_2O$ în 200 ml soluție de acid acetic 1%;

◆ acetat de sodiu 1%;

◆ soluție de glucide 1% (glucoză, lactoză, zaharoză).

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se pipetează 1 ml soluție din glucidul de analizat;

► se adaugă 1 ml reactiv Barfoed și 0,5 ml acetat de sodiu;

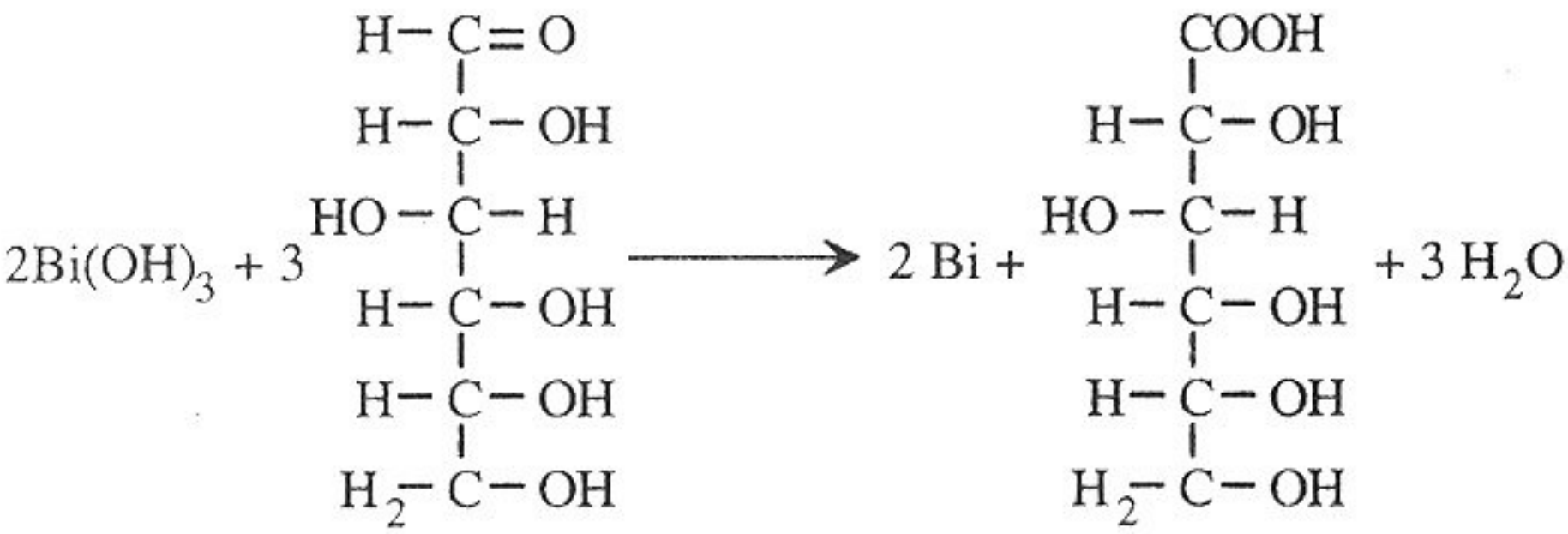
► conținutul eprubetei se agită energic și se încălzește pe baia de apă;

► apare un precipitat fin de Cu_2O pe pereții eprubetei după **2-3 minute** la **glucoză** și **10 - 12 minute** pentru **lactoză**.

V.3.3.5. REACȚIA NYLANDER

Principiul reacției. Ozele reduc la cald și în mediu alcalin sărurile de bismut, rezultând **bismut metalic** care se depune pe pereții eprubetei. Reacțiile care au loc sunt prezentate mai jos:

$$Bi(OH)_2NO_3 + NaOH \rightarrow Bi(OH)_3 + NaNO_3$$



Reactivi:

◆ reactivul Nylander se prepară astfel:

■ 10 g NaOH;

■ 4 g sare Seignette

- 2 g subnitrat de bismut;
- apă distilată până la 100 ml;
- soluția se încălzește pe o baie de apă, se răcește și se filtrează;

◆ soluții de glucid 1%.

Tehnica re lucru:

► într-o eprubetă se pipetează 1 - 2 ml soluție de glucide;

► se adaugă 0,5 - 1 ml reactiv Nylander și 2 ml apă distilată;

► amestecul se încălzește până la fierbere;

► în eprubetele cu glucide reducătoare apare un precipitat brun care treptat devine negru.

V.3.3.6. REACȚIA TOLLENS

Principiul reacției. La cald și într-un mediu alcalin, ozele reduc azotatul de argint amoniacal la argint metalic.

Obținerea hidroxidului diamoniacoargentic (reactivul Tollens) se realizează astfel:

• într-o eprubetă se pipetează 1 ml azotat de argint 5%;

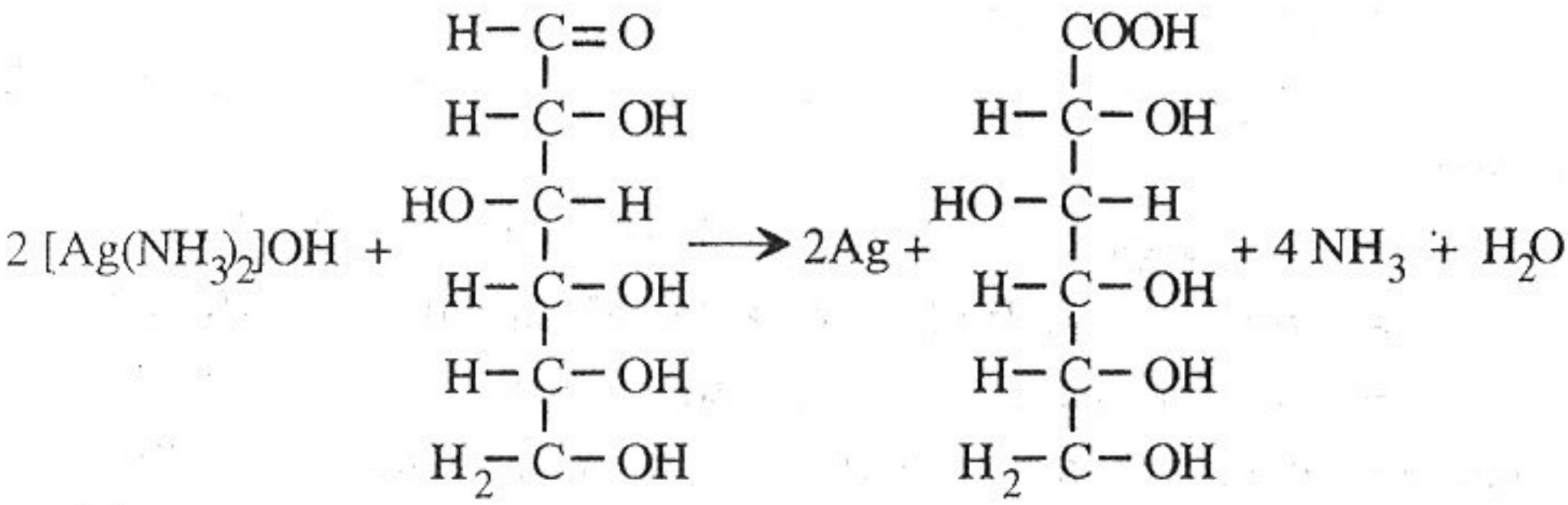
• se adaugă hidroxid de amoniu 20% până la dizolvarea oxidului de argint format inițial;

• rezultă hidroxidul diamoniacoargentic, conform reacției:

$$2\ AgNO_3 + 2\ NH_4OH \rightarrow Ag_2O + 2\ NH_4NO_3 + H_2O$$

$$Ag_2O + 4\ NH_4OH \rightarrow 2\ [Ag(NH_3)_2]OH + 3\ H_2O.$$

Reacția de reducere a reactivului Tollens de către glucoză este prezentată în cele ce urmează:



Tehnica de lucru:

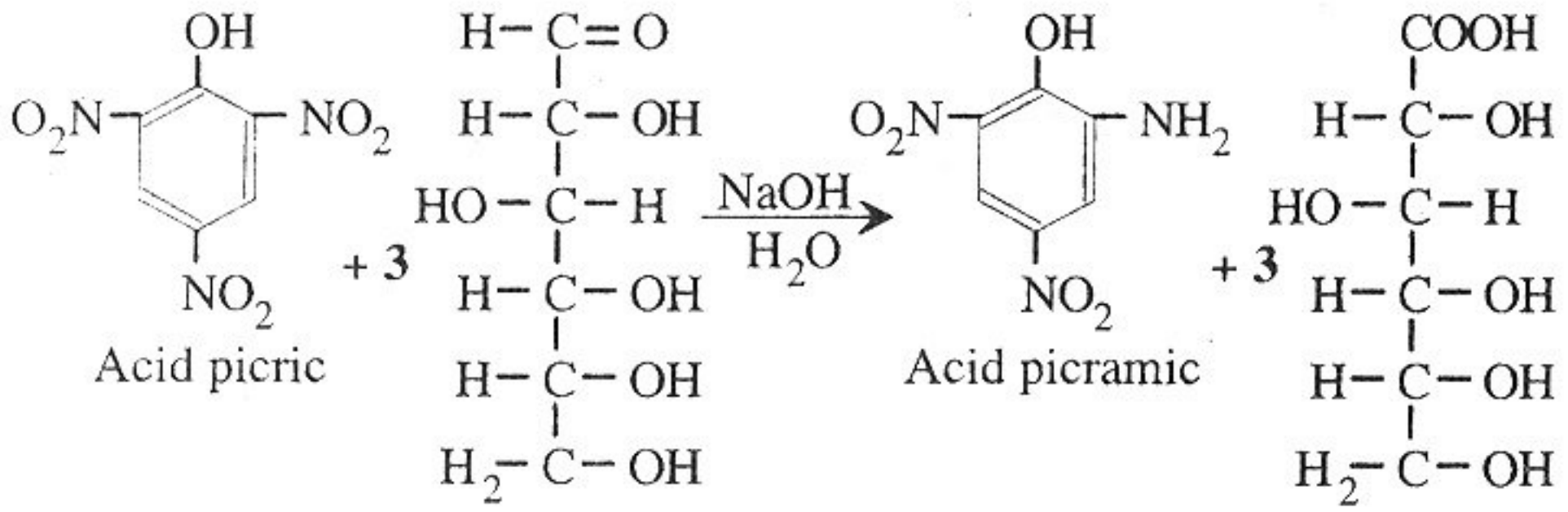
► într-o eprubetă se introduc 0,5 ml glucid reducător și 1 ml reactiv Tollens;

► se menține pe baie de apă la 40 - 50ºC, timp de 10 - 15 minute;

► în eprubetele cu glucide reducătoare argintul se depune pe pereții eprubetei sub forma unei oglinzi de argint.

V.3.3.7. REACȚIA CU ACID PICRIC

Principiul reacției. În mediu alcalin și la cald, ozele reduc acidul picric, galben, la acid picramic de culoare roșu portocaliu, conform reacției:



Reactivi:

- acid picric 0,5%;
- hidroxid de sodiu 10%;
- soluție 1% de glucoză, lactoză, zaharoză, amidon.

Tehnica re lucru:

► în patru eprubete se pipetează 1 - 2 ml din soluțiile de glucide;

► se adaugă 2 - 3 ml acid picric și 1 - 2 ml NaOH 18%;

► eprubetele se fierb pe baia de apă timp de circa 10 minute;

► în eprubetele cu oze reducătoare, culoarea galbenă a acidului picric virează în roșu portocaliu, culoarea acidului picramic;

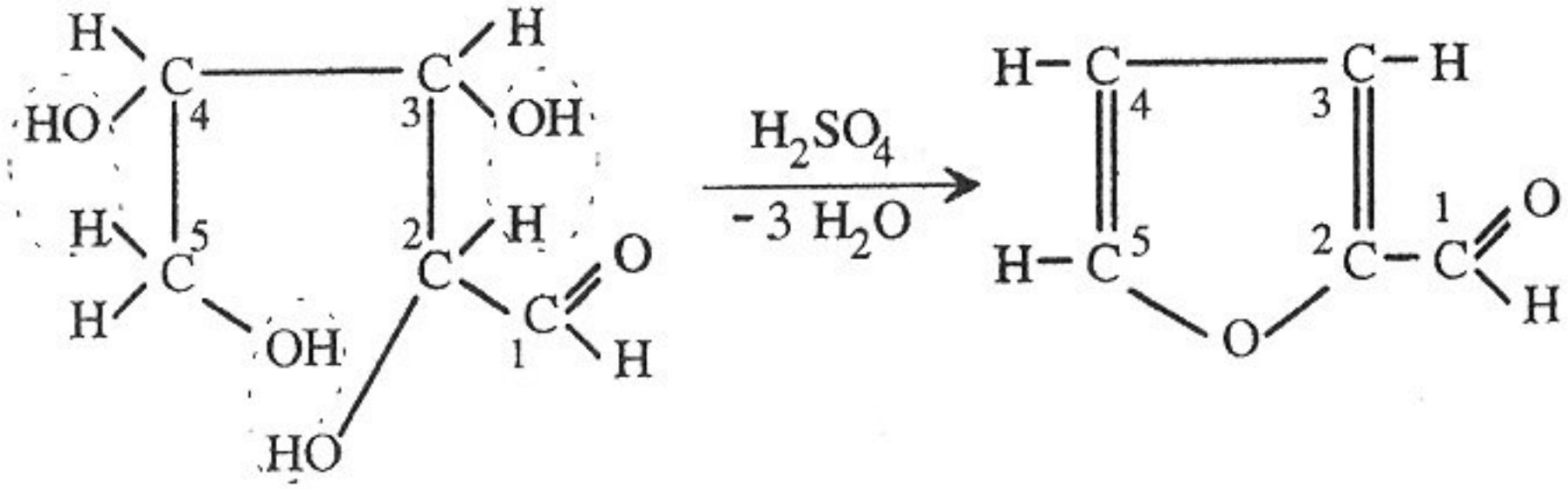
► intensitatea coloratiei este dependentă de concentrația glucidului reducător.

V.3.4. REACȚII DE CULOARE ALE GLUCIDELOR

V.3.4.1. PRINCIPIUL REACȚIILOR. CLASIFICARE

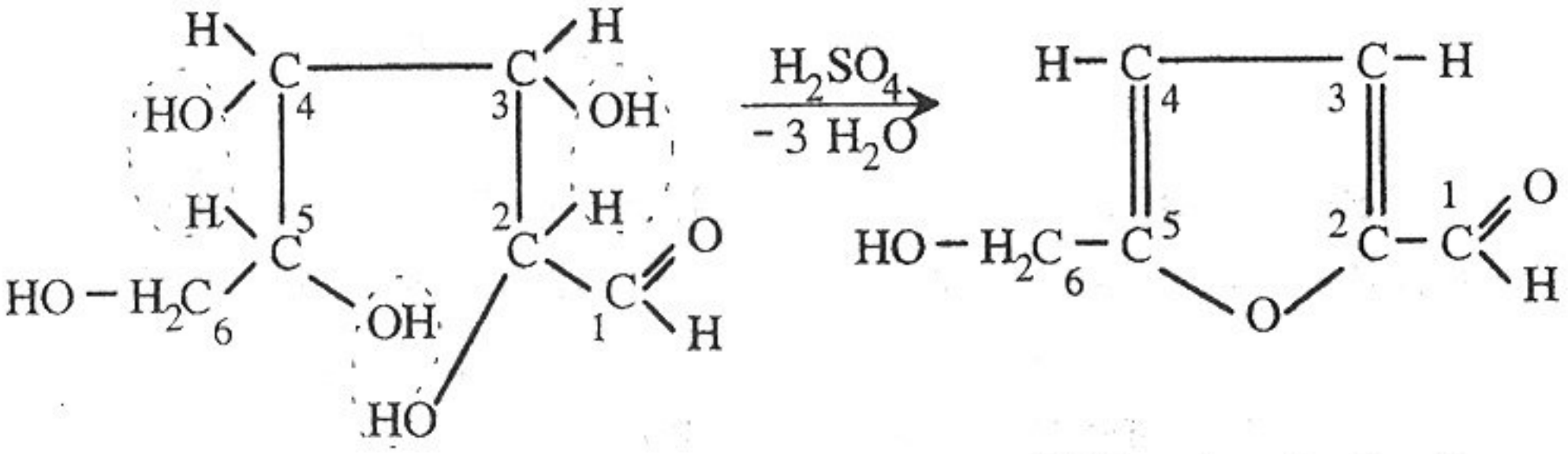
Sub acțiunea acizilor minerali concentrați (H_2SO_4, HCl) și la cald, prin eliminarea intramoleculară a trei molecule de apă, ozele se deshidratează și se formează compuși ciclici:

◆ în cazul **pentozelor,** eliminarea celor trei molecule de apă se realizează între atomii de carbon 2 - 3, 4 - 5 și 2 - 5 transformându-se într-un compus ciclic denumit **furfural:**



[Pentoză] [Furfural]

◆ în cazul **hexozelor,** eliminarea de apă se realizează tot între atomii de carbon 2 - 3, 4 - 5, 2 - 5, transformându-se într-un compus ciclic **hidroximetilfurfural:**



[Hexoză] [Hidroximetilurfural]

Oligozaharidele și polizaharidele sunt mai întâi hidrolizate până la oze, după care dau reacțiile de mai sus.

Reacțiile care au loc în mediu acid se pot clasifica astfel (vezi tabelul V.7.).

◆ **reacții generale** care sunt pozitive pentru toate ozele, indiferent de natura grupei carbonil sau de numărul de atomi de carbon pe care îi conțin;

◆ **reacții specifice** sau particulare prin care putem diferenția aldozele de cetoze, precum și pentozele de hexoze.

TABELUL V.7. REACȚII DE CULOARE ALE GLUCIDELOR.

Tipul reacției	Denumirea reacției	Reactivul de condensare	Observații
Generale	◆ Molisch-Udranszchi	► α-naftol	• coloratie violetă
	◆ Pierre-Thomas (universală)	► triptofanul	• coloratii diferite
	◆ Timol	► 3-metil-6-izopropil fenol	• coloratie carmin
	◆ Dreiwood	► antrona	• coloratie verde
Particulare	◆ Bial	► orcinol (5-metil rezorcina)	• specifică pentozelor (diferențiere)
	◆ Pierre-Thomas	► β-naftol	• specifică pentozelor (diferențiere)
	◆ Tollens	► floroglucina	• specifică pentozelor (diferențiere)
	◆ Seliwanoff	► rezorcina (1,3-dihidroxi benzen)	• specifică cetozelor (diferențiere)

V.3.4.2. REACȚIA MOLISCH - UDRANSZCHI

Principiul reacției. Furfuralul, respectiv hidroximetilfurfuralul, rezultați în urma deshidratării pentozelor sau hexozelor, se condensează cu α-naftolul, având ca rezultat un compus colorat în violet. Reacția este specifică grupării carbonil.

Dizaharidele și polizaharidele suferă în prealabil o reacție de hidroliză și apoi deshidratare și condensare.

Dacă nu se respectă condițiile de adăugare a acidului, se agită eprubeta sau soluția de α-naftol nu este proaspăt preparată nu se mai evidențiază prezența inelului violet la limita de separare dintre cele două straturi.

Reactivi:

- soluție glucoză 2%;
- soluție fructoză 2%;
- soluție arabinoză 2%;
- soluție lactoză 2%;
- soluție zaharoză 2%;
- soluție α-naftol 5% în alcool etilic;
- H_2SO_4 concentrat.

Tehnica de lucru:

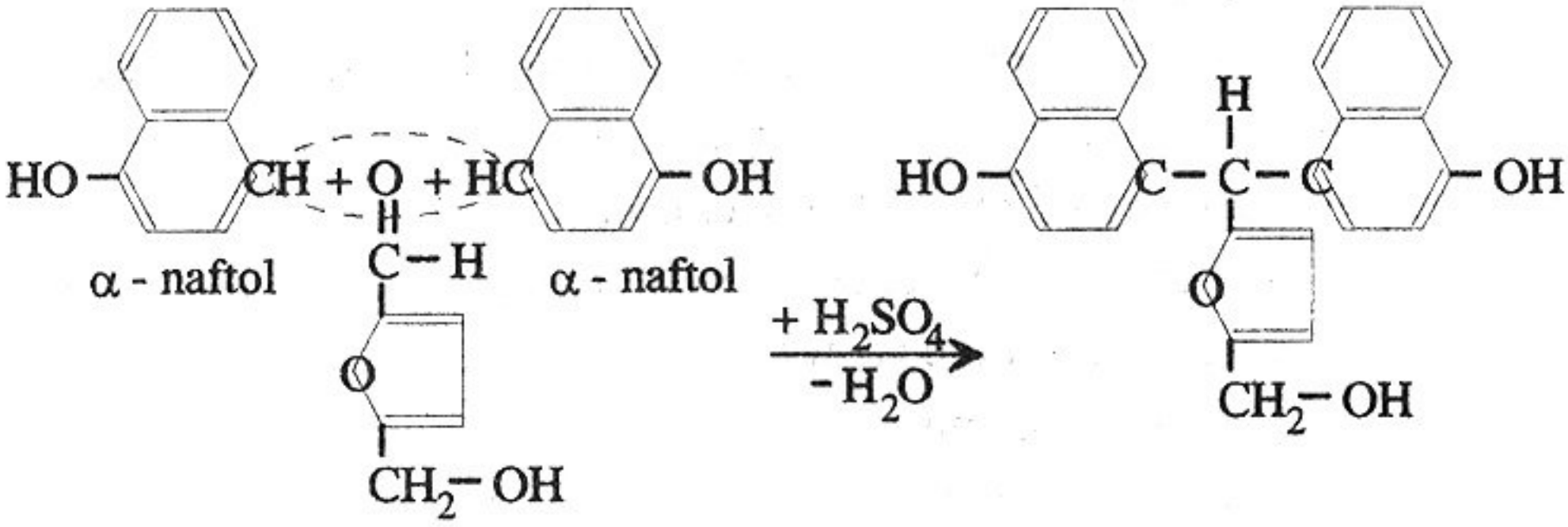
► într-o eprubetă se pipetează 1 - 2 ml soluție de glucid;

► se adaugă 4 - 5 picături din soluția alcoolică de α-naftol proaspăt preparată;

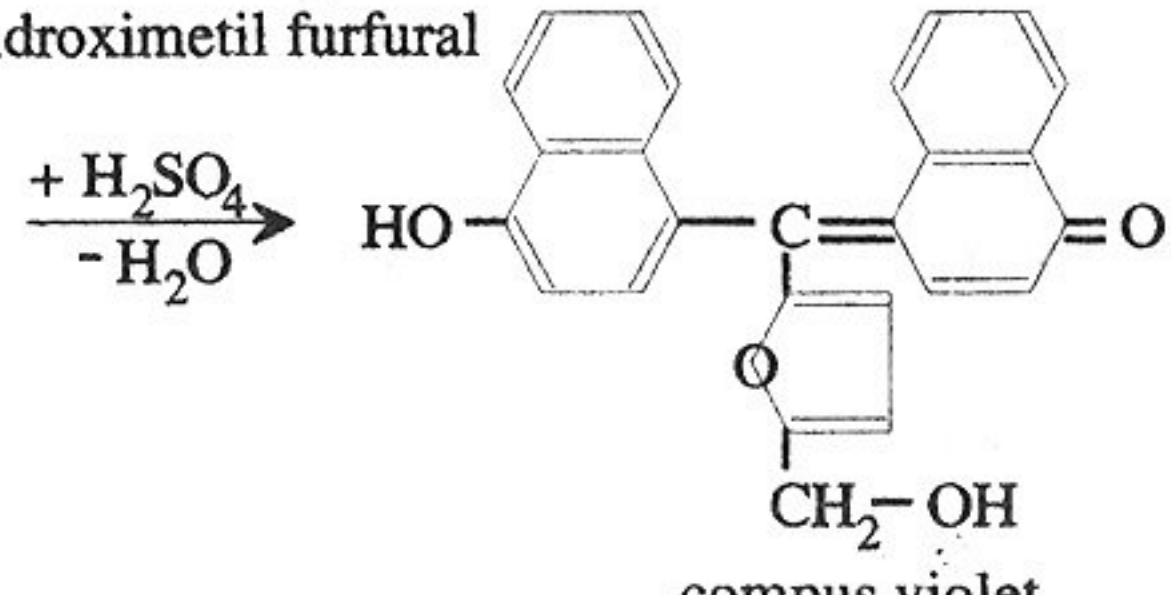
► se adaugă prelingând pe peretele eprubetei 1 ml H_2SO_4 concentrat;

► la limita de separare a celor două straturi apare un inel colorat în **violet**.

Reacția Molisch-Udranszchi se desfășoară conform următoarelor două etape:



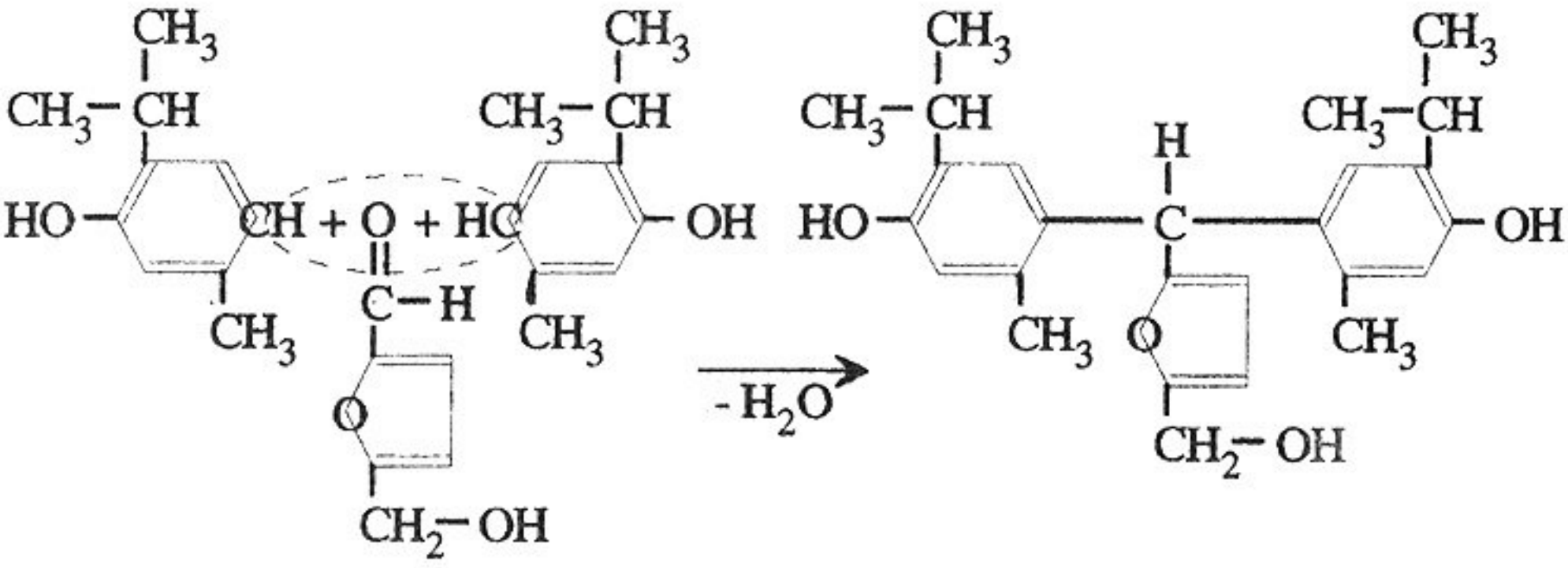
Hidroximetil furfural



compus violet

V.3.4.3. REACȚIA CU TIMOLUL

Principiul reacției. În mediu puternic acid, glucidele formează cu timolul (3-metil-6-izopropil fenol) un produs de condensare de culoare roșie carmin.



Reactivi:

- soluții de glucid 1%;
- acid clorhidric concentrat;
- soluție alcoolică de timol;

Tehnica de lucru:

- ► într-o eprubetă se pipetează 1 - 2 ml din soluția de glucid;
- ► se adaugă 2 - 3 ml din soluția alcoolică de timol;
- ► se adaugă 5 ml HCl concentrat;
- ► se agită și se încălzește conținutul eprubetei pe baie de apă;
- ► apare o colorație **roșu carmin.**

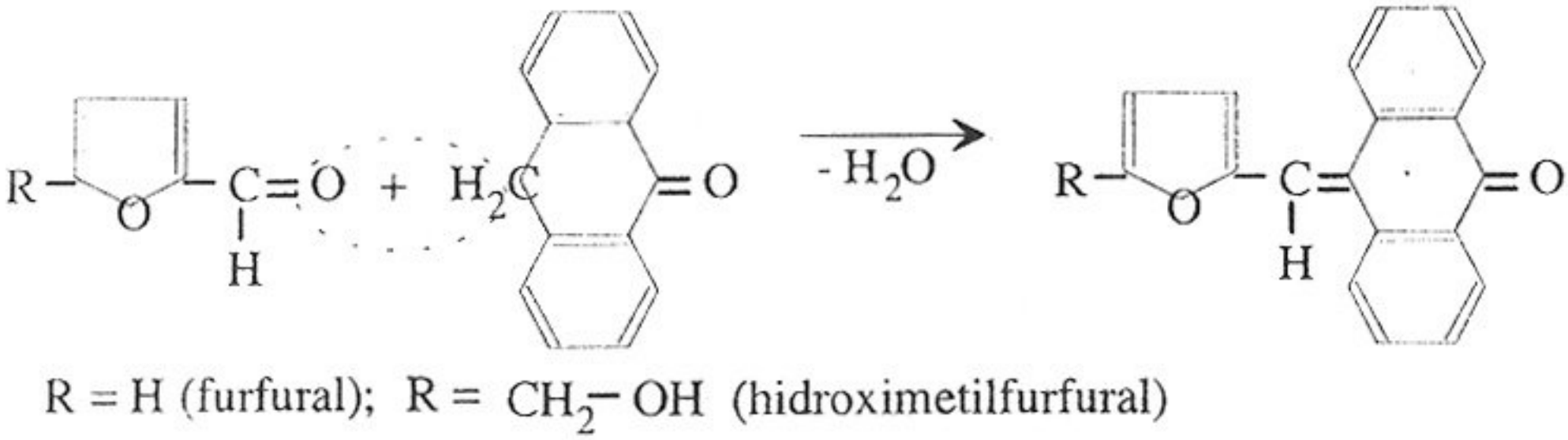
Notă: Reacția nu poate fi utilizată pentru identificarea glucidelor urinare, deoarece indoxilul urinar reacționează identic și falsifică rezultatele.

V.3.4.4. REACȚIA DREIWOOD (CU ANTRONA)

Principiul reacției. În mediu acid glucidele se condensează cu **antrona** formând un complex colorat în verde.

Condensarea are loc atât între gruparea aldehidică a furfuralului, cât și a hidroximetil furfuralului cu gruparea metilenică activă a antronei.

Reacția fiind foarte sensibilă servește și la determinarea cantitativă a glucidelor din materiale biologice. Metoda are însă neajunsul că nu este strict specifică ozelor.



R = H (furfural); R = CH_2-OH (hidroximetilfurfural)

Reactivi:

- ◆ soluție de **antronă** preparată după cum urmează:
  - ■ 0,5 g antronă se dizolvă în 800 ml H_2SO_4 66%;
  - ■ se încălzește la 80°C până la dizolvarea completă;
  - ■ se aduce la 1000 ml cu H_2SO_4 66%.

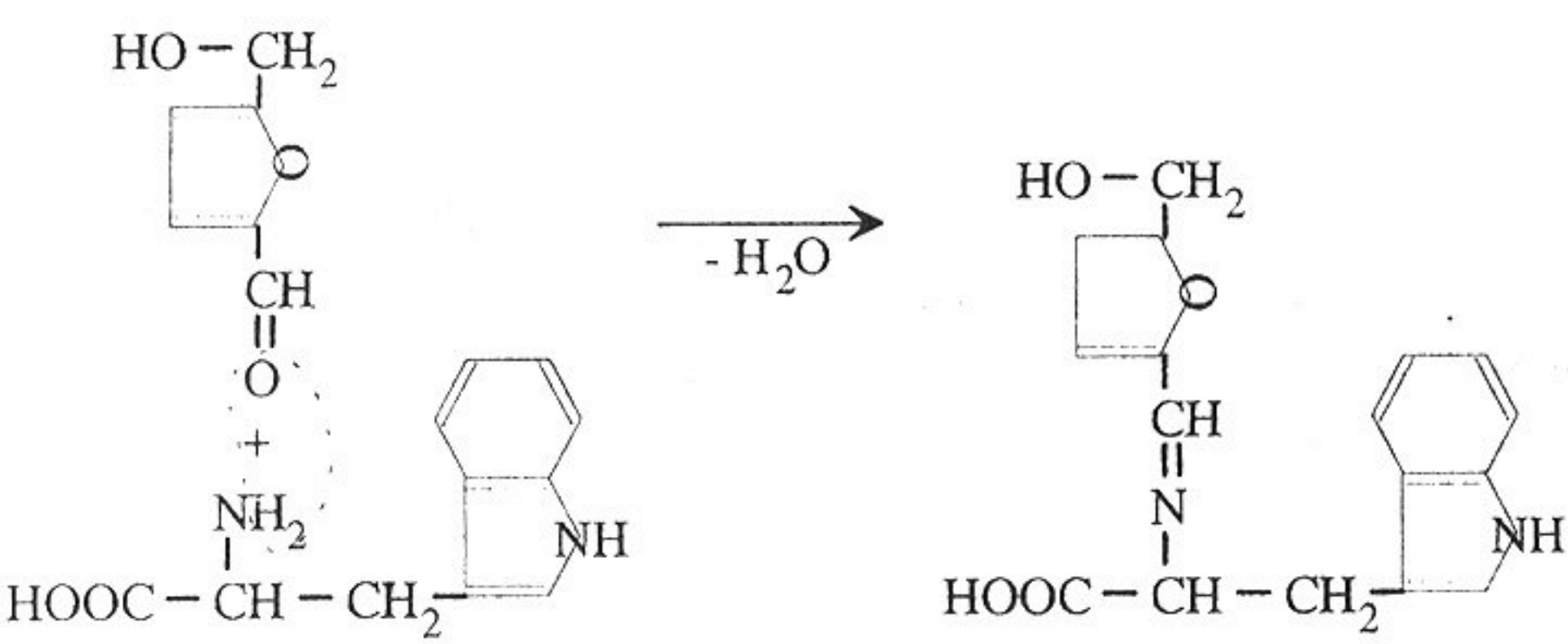
Tehnica de lucru:

- ► într-o eprubetă se măsoară 2 ml soluție de antronă;
- ► se adaugă 0,1 ml soluție din glucidul de analizat;
- ► în prezența glucidului se dezvoltă o coloratie verde.

V.3.4.5. REACȚIA UNIVERSALĂ THOMAS

Principiul reacției. Ozele, în mediu acid și la cald, se condensează cu triptofanul formând compuși colorați în mod diferit, caracteristici glucidului prezent în soluție.

Reacția poate fi folosită și la identificarea triptofanului.



Reactivi:

- ◆ soluție triptofan 0,1% în HCl 30%;
- ◆ soluție de glucide 1% (glucoză, fructoză, arabinoză, xiloză).

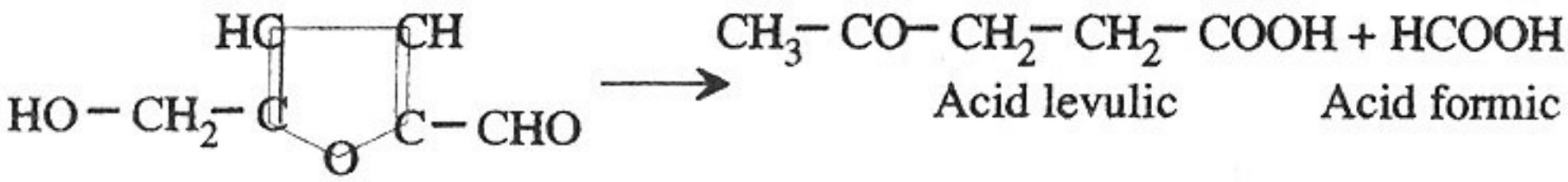
Tehnica de lucru:

- ► într-o eprubetă se introduc 2 ml soluție de triptofan;
- ► se adaugă 1 ml soluție glucid;
- ► în funcție de natura ozei se formează complexe colorate:
  - ■ brun - xiloza; ■ verde pal - arabinoza;
  - ■ roșu brun - fructoză; ■ violet - glucoză.

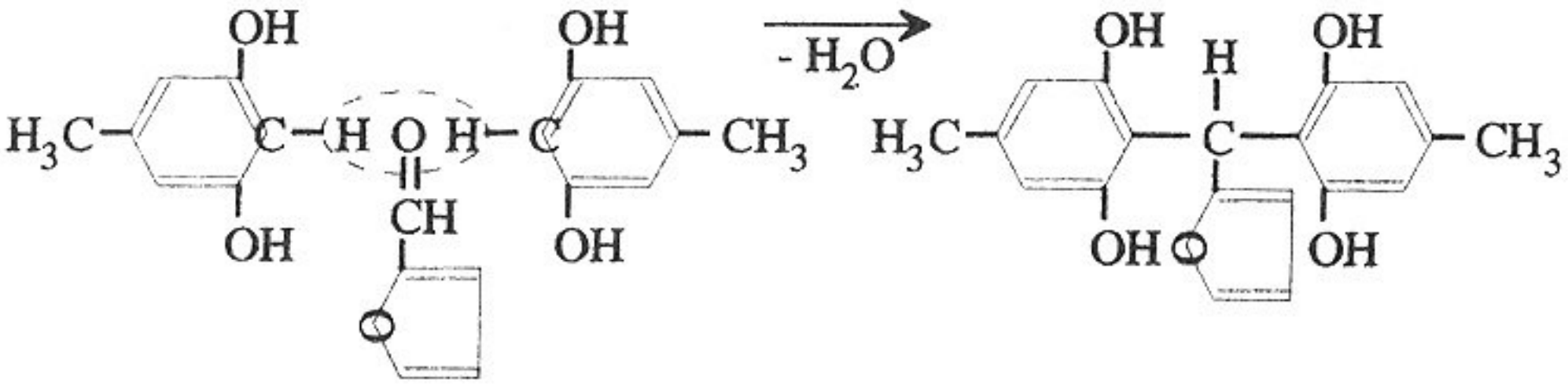
V.3.4.6. REACȚIA BIAL

Principiul reacției. Pentozele, în prezența orcinolului (5-metilrezorcina) și în mediu de HCl concentrat și $FeCl_3$, formează compuși de condensare colorați în **verde.**

Hexozele, în aceleași condiții, formează **hidroximetil-furfural,** care se va degrada până la acid levulic și acid formic care nu vor reacționa cu **orcinolul,** pentru a forma compușii colorați din clasa triarilmetanului.



Reacția Bial permite diferențierea pentozelor de hexoze. Reacția este folosită pentru dozarea spectrofotometrică a pentozelor din structura acizilor ribonucleici (ARN) și mononucleotidelor din produse biologice (metoda **Meybaum**).



Clorura ferică ($FeCl_3$), în mediu puternic acid, face să crească semnificativ **sensibilitatea** reacției.

Reactivi:

- ◆ reactivul Bial se prepară astfel:
  - ▪ 0,3 g orcinol se dizolvă în HCl concentrat;
  - ▪ 0,25 cm^3 soluție $FeCl_3$ 10%;
  - ▪ se aduce la 100 cm^3 cu HCl concentrat într-un balon cotat;
- ◆ soluție de arabinoză și de glucoză 1%.

Tehnica de lucru:

- ► într-o eprubetă se introduc 2 ml reactiv Bial;

► se încălzește timp de 5 minute în flacăra unui bec de gaz sau în baie de apă;

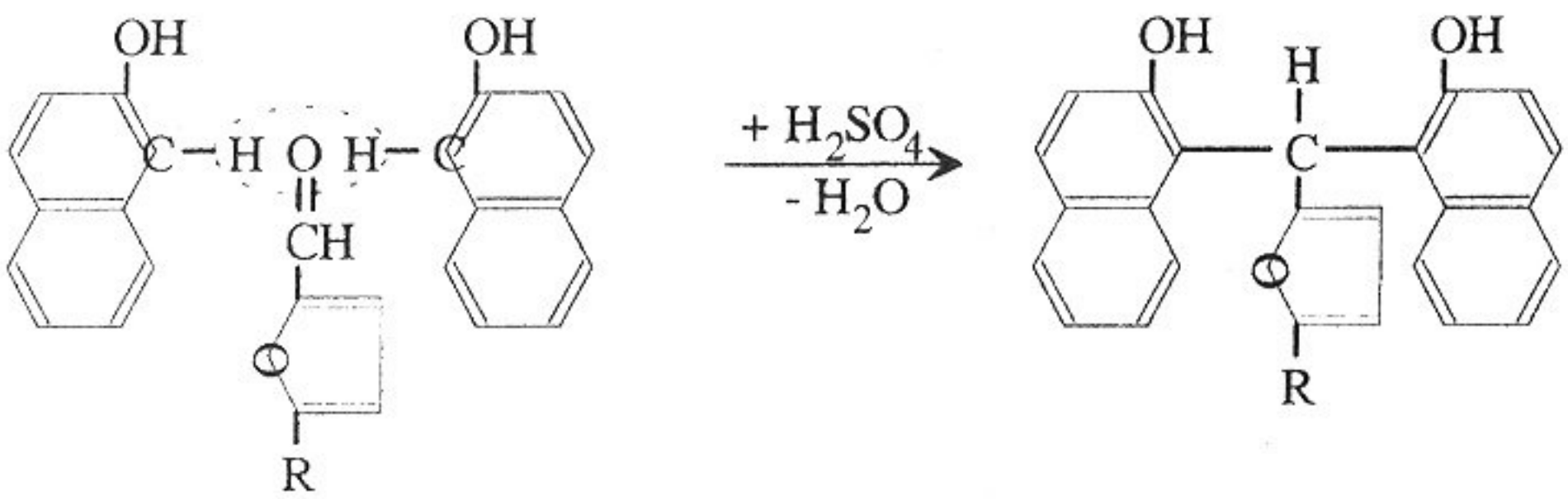
► se adaugă 5 - 6 picături soluție de arabinoză;

► se continuă încălzirea încă 2 - 4 minute, conținutul eprubetei colorându-se în verde;

► în aceleași condiții, glucoza nu se colorează.

V.3.4.7. REACȚIA PIERRE - THOMAS

Principiul reacției. Pentozele și hexozele, în mediu puternic acid, se condensează cu β-naftolul formând compuși diferit colorați. Cu această reacție este posibilă diferențierea pentozelor de hexoze.



R = H (furfural); R = CH_2– OH (hidroximetilfurfural)

Reactivi:

◆ soluție de β-naftol 0,3% în H_2SO_4;

◆ soluție de glucoză și arabinoză 1%.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc 3 ml soluție de β-naftol;

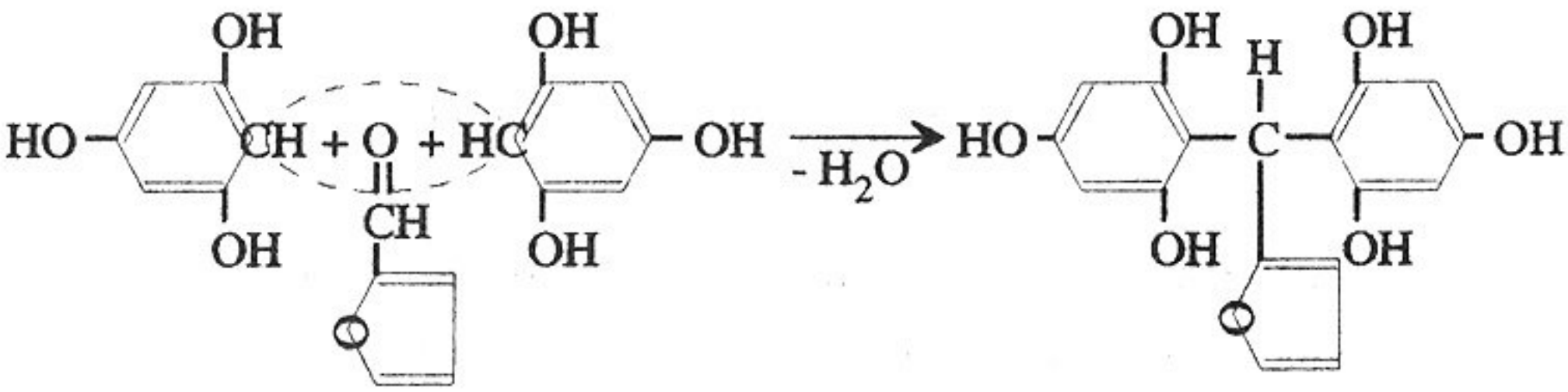
► se prelinge pe pereții eprubetei 1 ml soluție glucid;

► în prezența pentozelor, la limita de separație dintre cele două soluții apare un inel **albastru brun**;

► în aceleași condiții, în prezența hexozelor apare un inel **verde brun**.

V.3.4.8. REACȚIA TOLLENS (FLOROGLUCINĂ)

Principiul reacției. Pentozele, în mediu acid, se condensează cu floroglucina (1,3,5-trihidroxibenzen), având ca rezultat un complex roșu vișiniu.



Reacția **Tollens** cu **floroglucină** este specifică pentozelor. Proprietatea floroglucinei de a forma un precipitat cu furfuralul rezultat din pentoze a fost utilizată pentru determinarea acestora pe cale gravimetrică.

Reactivi:

- soluție floroglucină 0,2% în HCl 25%;
- acid clorhidric concentrat;
- soluție arabinoză 1% în apă distilată.

Tehnica de lucru:

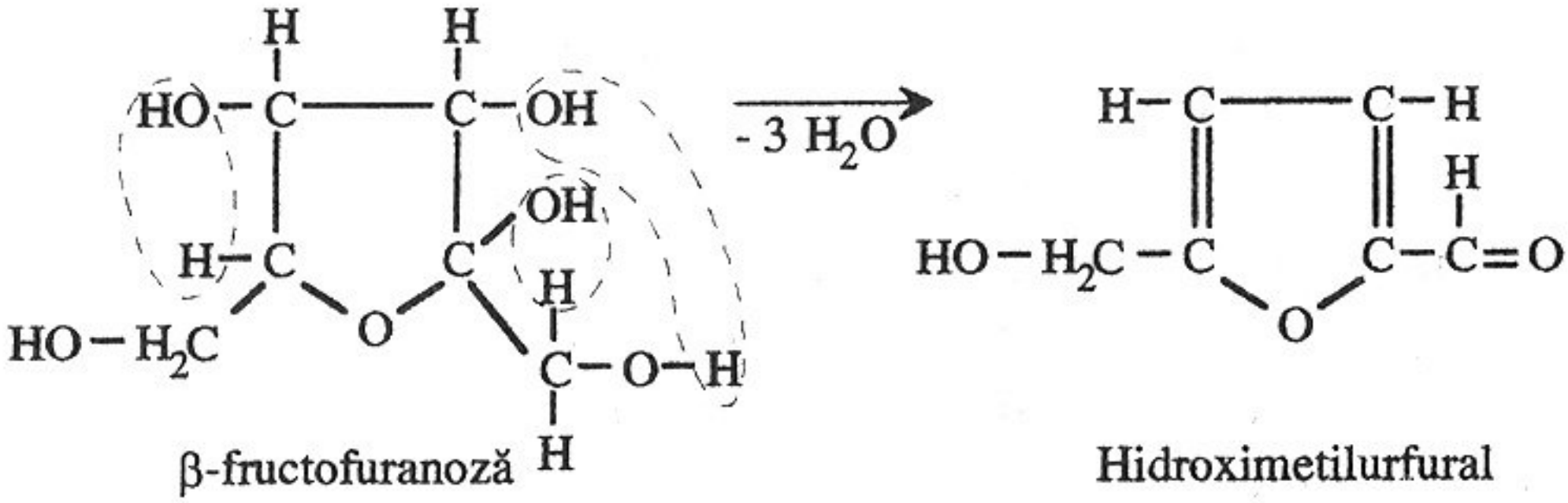
- ► se pipetează într-o eprubetă 2 ml soluție floroglucină 0,2%;
- ► se încălzește până la fierbere;
- ► se adaugă 0,2 - 0,4 ml soluție de pentoză;
- ► se constată apariția unei colorații roz care trece în roșu vișiniu;
- ► după răcirea soluției se poate observa apariția unui precipitat colorat.

V.3.4.9. REACȚIA SELIWANOFF

Principiul reacției. Cetozele (fructoza), prin încălzire cu HCl concentrat și cu rezorcină (1,3-dihidroxibenzen), formează compuși colorați în roșu vișiniu. În condițiile experimentale ale reacției

Seliwanoff, transformarea aldozelor în hidroximetilfurfural nu se produce, fapt ce determină specificitatea acestei reacții pentru cetoze.

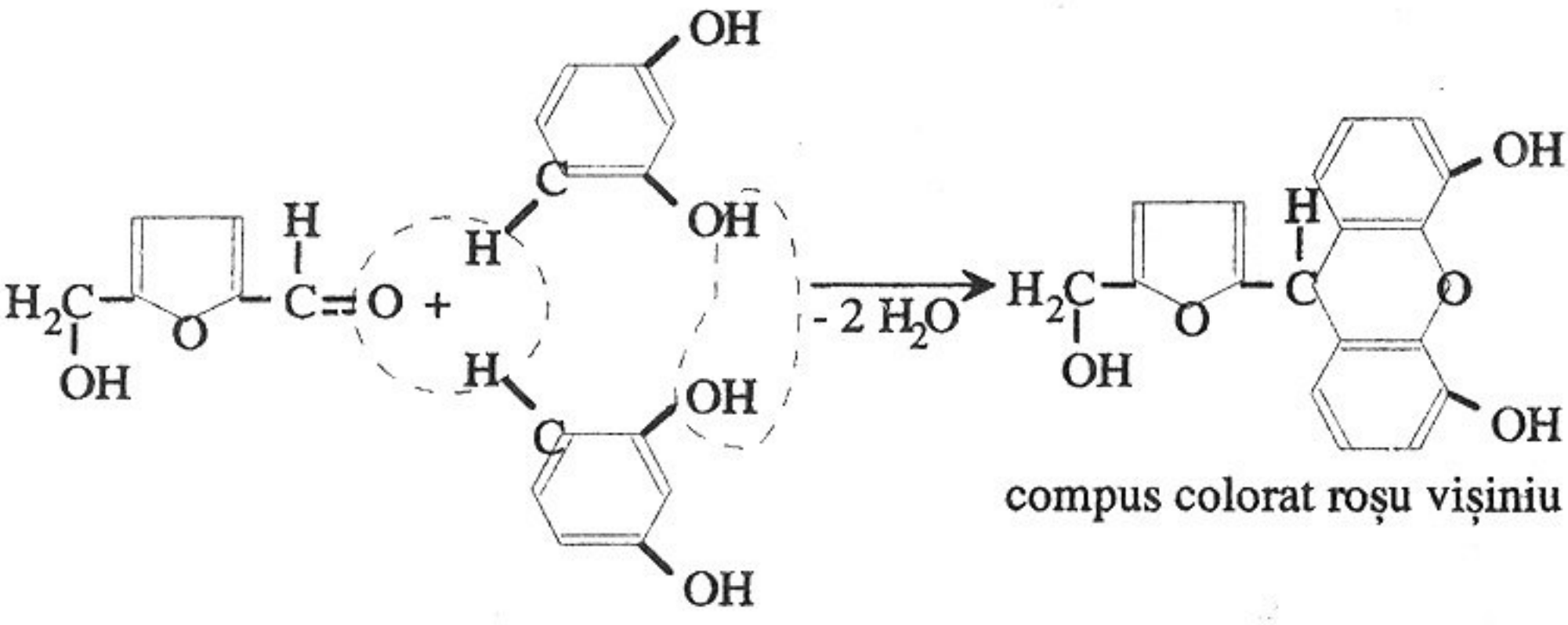
Fructoza se transformă în hidroximetilfurfural mult mai rapid decât glucoza, deoarece are loc o deshidratare a formei furanozice:



β-fructofuranoză

Hidroximetilurfural

Reacția cu rezorcina, decurge după cum urmează:



compus colorat roșu vișiniu

Reactivi:

- soluții de glucoză, fructoză 1%;
- reactivul Seliwanoff se prepară astfel: în 100 ml HCl 20% se dizolvă 0,5 g rezorcină.

Tehnica de lucru:

- în două eprubete se introduc 1 - 2 ml reactiv Seliwanoff;
- în prima eprubetă se adaugă 1 - 2 ml soluție de **glucoză**, iar în cea de a doua soluție de **fructoză**;
- eprubetele se încălzesc 10 minute pe o baie de apă la fierbere;

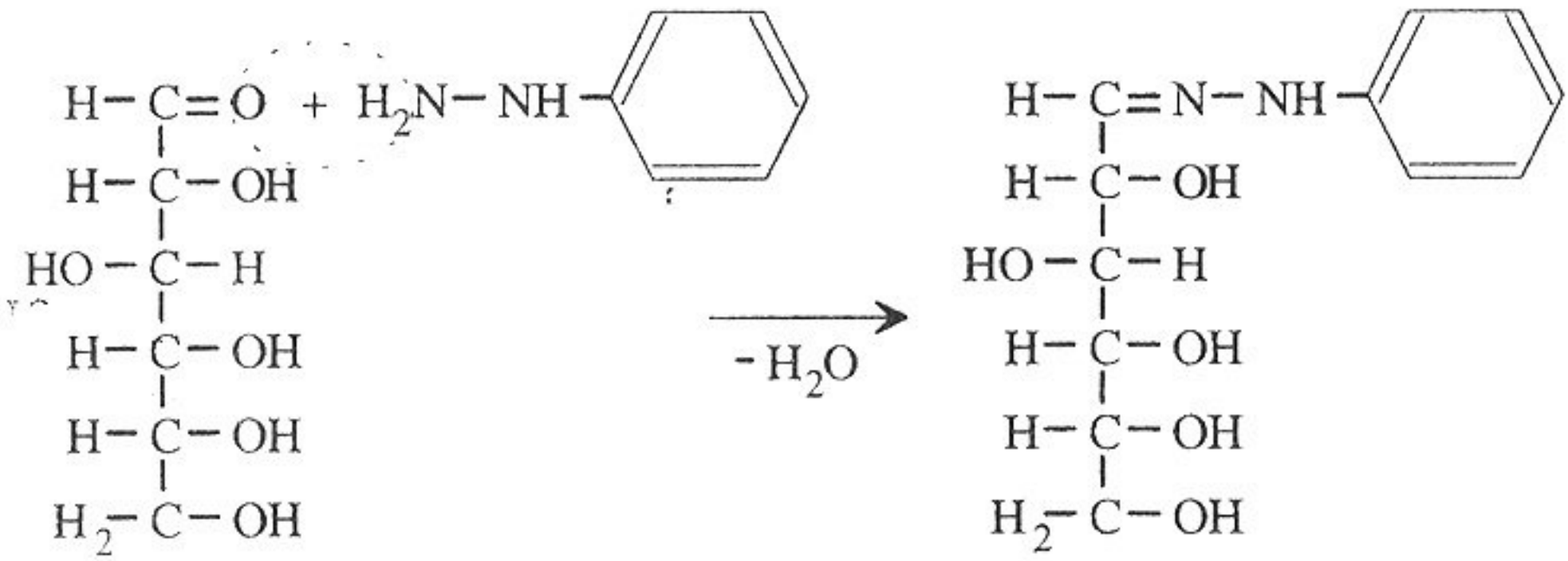
► conținutul eprubetei cu fructoză se va colora în roșu vișiniu, în timp ce eprubeta cu glucoză devine slab roz.

V.3.5. REACȚIA DE CONDENSARE CU FENILHIDRAZINA (DÉNIGÉS)

Principiul reacției. Ozele se condensează cu fenilhidrazina (C_6H_5 - NH - NH_2) la cald și în mediu de acid acetic, formând **osazone** cristalizate caracteristic. Osazonele se prezintă sub formă de substanțe cristalizate de culoare galbenă, greu solubile în apă. Ozele se pot diferenția una de alta prin unele caracteristici fizice ale osazonelor și aspectul cristalelor. Ozele epimere (glucoza, fructoza, manoza) formează osazone identice.

Osazonele se formează în mai multe etape succesive:

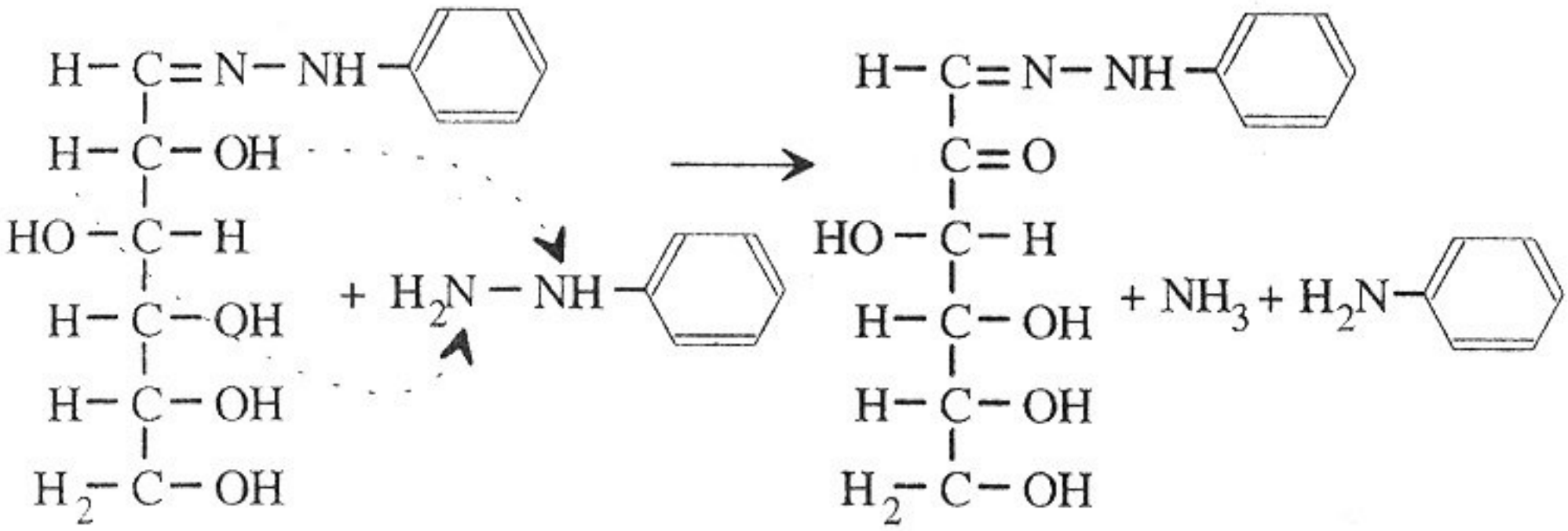
➢ în prima etapă are loc reacția între gruparea aldehidică a glucozei și fenilhidrazina, formându-se fenilhidrazona:



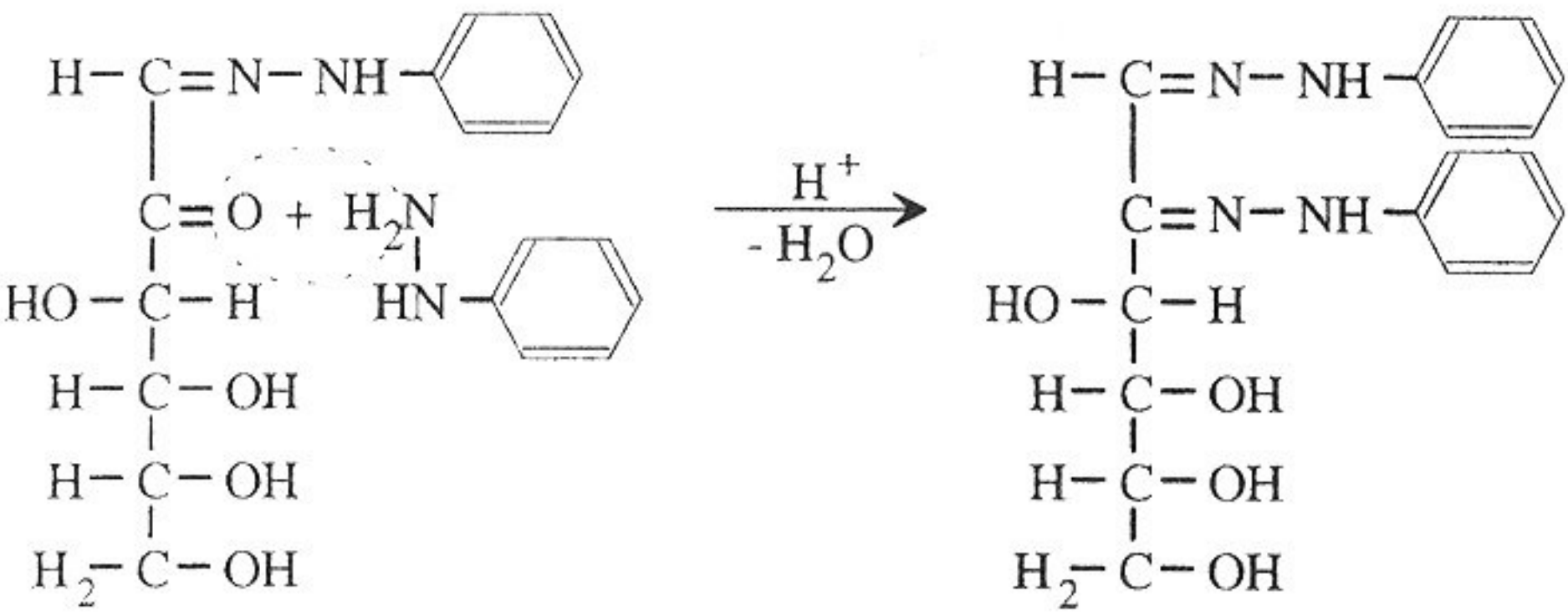
glucoză — glucofenilhidrazonă

Fenilhidrazonele sunt substanțe incolore, ușor solubile în apă, care prin hidroliză în mediu puternic acid se descompun, punând în libertate glucidul inițial.

➢ în etapa a doua fenilhidrazona reacționează cu o nouă moleculă de fenilhidrazină, având loc oxidarea grupării alcoolice secundare de la cel de al doilea atom de carbon, în timp ce molecula de fenilhidrazină se descompune în anilină și amoniac:

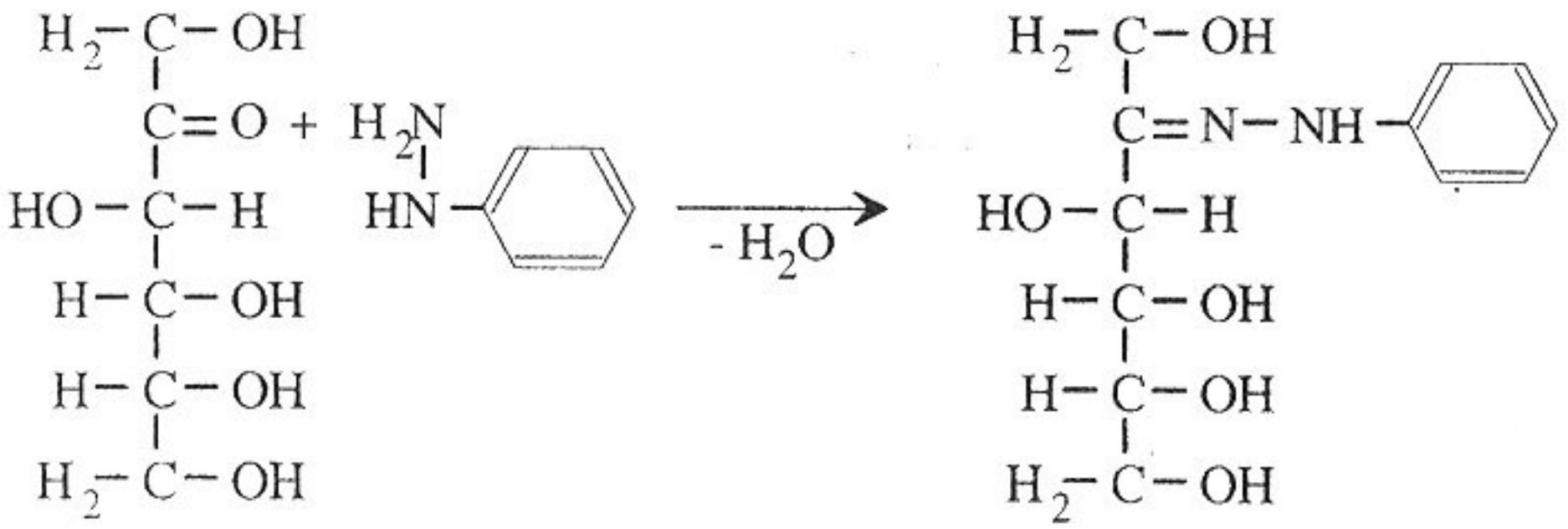


➢ în etapa a treia, produsul intermediar format se condensează cu a treia moleculă de fenilhidrazină rezultând osazona; reacția are loc numai în mediu acid:



Obținerea cristalelor de osazonă se realizează prin adăugarea în mediul de reacție a unei soluții saturate de clorură de sodiu, amestecul încălzindu-se pe o baie de apă.

➢ fructoza care este o cetohexoză reacționează cu fenilhidrazina la nivelul grupării cetonice:



➢ în etapa a doua are loc oxidarea grupării alcool primar (C_1) cu formarea de grupare carbonil (- CHO);

➢ în etapa a treia prin condensarea cu fenilhidrazina se formează osazona tipică glucozei.

Reactivi:

- soluție de glucoză, fructoză, galactoză 1%;
- soluție saturată de NaCl;
- fenilhidrazină (clorhidrat); ◆ acid acetic glacial.

Tehnica de lucru:

► în eprubete separate se măsoară 2 - 3 ml glucide;

► se adaugă 1 ml soluție saturată de NaCl;

► se adaugă 3 picături de acid acetic glacial și 10 picături de fenilhidrazină;

► eprubetele se mențin 20 - 30 minute pe o baie de apă fierbinte;

► apar cristale galbene de osazone care sunt examinate la microscop.

V.3.6. REACȚII DE IDENTIFICARE A DIZAHARIDELOR

Din categoria oligozaharidelor, o importanță biochimică majoră pentru organismul uman o au dizaharidele care, teoretic, se formează prin eliminarea unei molecule de apă între două molecule de hexoze.

$$C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{-H_2O} C_{12}H_{22}O_{11}$$

După modul cum se realizează eliminarea moleculei de apă, dizaharidele pot avea caracter **reducător** sau **nereducător**.

Dacă eliminarea apei se face între gruparea - OH semiacetalică a unei oze și gruparea - OH alcoolică aparținând altei oze, se formează o legătură **monocarbonilică,** caracteristică dizaharidelor **reducătoare.**

În cazul în care eliminarea apei se face între grupările - OH semiacetalice aparținând ambelor oze, se formează o legătură **dicarbonilică**, caracteristică unui compus **nereducător**.

Deci, reacțiile de identificare se bazează pe caracterul reducător sau nereducător al acestora.

Principalele diglucide importante din punct de vedere biologic pentru organismul uman sunt: maltoza, lactoza, zaharoza. Dintre acestea, **lactoza** este singurul diglucid de origine animală.

➢ **Identificarea dizaharidelor reducătoare.**

Reacția Fehling. Principiul reacției. Dizaharidele reducătoare au proprietatea de a reduce la cald hidroxidul de cupru cu formarea unui precipitat roșu - cărămiziu de oxid cupros. În aceleași condiții, pentru cele nereducătoare, reacția Fehling este negativă.

Reactivi: ◆ soluție Fehling I și II; ◆ soluție lactoză 1%;

◆ soluție maltoză 1%; ◆ soluție zaharoză 1%.

Tehnica de lucru:

► în trei eprubete se introduc separat 1 ml Fehling I și 1 ml Fehling II și se încălzește conținutul eprubetelor la fierbere;

► în prima eprubetă se adaugă un volum egal din soluția de lactoză;

► în a doua eprubetă se introduce soluție de maltoză;

► în a treia eprubetă se introduce soluție de zaharoză;

► se continuă încălzirea la fierbere.

➢ **Interpretarea rezultatelor:**

■ în primele două eprubete se constată apariția unui precipitat roșu cărămiziu de oxid cupros (Cu_2O), datorită faptului că maltoza și lactoza sunt reducătoare;

■ în eprubeta care conține zaharoza, reacția Fehling este negativă, deoarece zaharoza este un diglucid nereducător.

➢ **Formarea de osazone (Dénigés).**

Dizaharidele reducătoare (lactoza, maltoza) se condensează la cald cu fenilhidrazina, în mediu de acid acetic la cald, formând osazonele respective cristalizate caracteristic.

Examinate la microscop cristalele apar astfel:

■ cristalele de lactosazonă au aspectul unor scaieți;

■ cristalele de maltosazonă au formă aciculară;

■ zaharoza nu poate forma osazone, deoarece nu are grupare carbonil liberă.

➢ **Hidroliza acidă a zaharozei.**

Prin hidroliza cu acizi minerali, zaharoza se scindează în glucoză și fructoză. În hidrolizat se identifică glucoza cu reactivul Fehling și fructoza cu reactivul Seliwanoff.

Reactivi: ◆ soluție zaharoză 2%;

◆ H_2SO_4 concentrat; ◆ reactiv Fehling I + II;

◆ reactiv Seliwanoff; ◆ soluție Na_2CO_3 5%.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se pipetează 10 ml soluție de zaharoză și 2 - 3 picături de H_2SO_4 concentrat;

► eprubeta este ținută 10 minute în baia de apă la fierbere;

► după răcire, hidrolizatul este neutralizat cu soluție de Na_2CO_3 5% în prezență de turnesol, iar soluția se împarte în două eprubete;

► în prima eprubetă se efectuează reacția Fehling care va fi pozitivă datorită prezenței glucozei;

► în eprubeta a doua se practică reacția Seliwanoff care va fi pozitivă datorită prezenței fructozei.

V.3.7. REACȚII DE IDENTIFICARE A POLIZAHARIDELOR

Polizaharidele sunt substanțe biomacromoleculare, fiind produși de policondensare a unui mare număr de oze legate glicozidic sau între doi hidroxili alcoolici.

Reacția de culoare cu iodul.

Principiul reacției. Soluția de **amidon**, în prezența iodului în iodură de potasiu (reactiv Lugol) dezvoltă o coloratie **albastră**, care dispare la cald și reapare la rece.

Culoarea pe care amidonul o dezvoltă în prezența iodului se datorește formării unor combinații de incluziune, prin pătrunderea iodului în spațiul din interiorul spirelor helicoidale de unități de glucoză.

Cele mai importante polizaharide pentru organismul uman sunt **amidonul,** de origine **vegetală** și **glicogenul,** de origine **animală**.

Amidonul și glicogenul sunt insolubile în apă rece, dar la cald formează soluții omogene, opalescente. Ambele se pot identifica și diferența prin reacția de culoare caracteristică pe care o dau în prezența iodului (reacția Lugol).

Spre deosebire de amidon, **glicogenul,** în prezența iodului, dezvoltă o coloratie **roșie - brună**. Unele specii moleculare de glicogen nu se colorează în prezența iodului. Reacția este foarte sensibilă, chiar și la diluții mari.

Reactivi:

- soluție **Lugol** preparată astfel:
  - 1 g iod metalic;
  - 2 g iodură de potasiu;
  - apă distilată până la 100 ml;
- soluție de amidon 1%;
- soluție de glicogen 1%.

Tehnica de lucru:

► în două eprubete se introduc separat 2 ml soluție amidon, respectiv glicogen;

► în fiecare eprubetă se introduc 2 - 3 picături de soluție Lugol;

► soluția de **amidon** se va colora în **albastru**, iar dacă soluția se încălzește la fierbere se observă că în timp ce temperatura crește, culoarea albastră dispare treptat;

► răcind soluția culoarea albastră reapare;

► în eprubeta cu **glicogen,** în prezența iodului se va dezvolta o coloratie **roșie-brună**, care nu este influențată de creșterea temperaturii.

Reacția de hidroliză a amidonului.

Atât amidonul, cât și glicogenul **nu** manifestă **proprietăți reducătoare,** fiindcă marea majoritate a hidroxililor semiacetalici sunt angajați în legarea cu un hidroxil alcoolic.

Prin hidroliză acidă sau enzimatică totală se vor scinda treptat până la maltoză și glucoză, care, datorită caracterului lor reducător, prezintă reacțiile de reducere pozitive.

Principiul reacției. În prezența acizilor minerali tari (HCl), amidonul este hidrolizat până la stadiul de glucoză, trecând prin fazele intermediare cu mase moleculare mici, denumite **dextrine.**

Prin hidroliză intensitatea colorației cu iodul dispare, în timp ce proprietatea reducătoare a produșilor de hidroliză crește. De aceea, mersul hidrolizei poate fi urmărit cu ajutorul soluției **Lugol** și **Fehling.**

Etapele hidrolizei amidonului sunt următoarele:

amidon → amilodextrine → eritrodextrine →

→ flavodextrine → acrodextrine → maltoză → glucoză.

Reactivi:

◆ soluție amidon 1%; ◆ HCl concentrat; ◆ soluție Lugol;
◆ reactiv Fehling I + II; ◆ soluție NaOH 5%.

Tehnica de lucru:

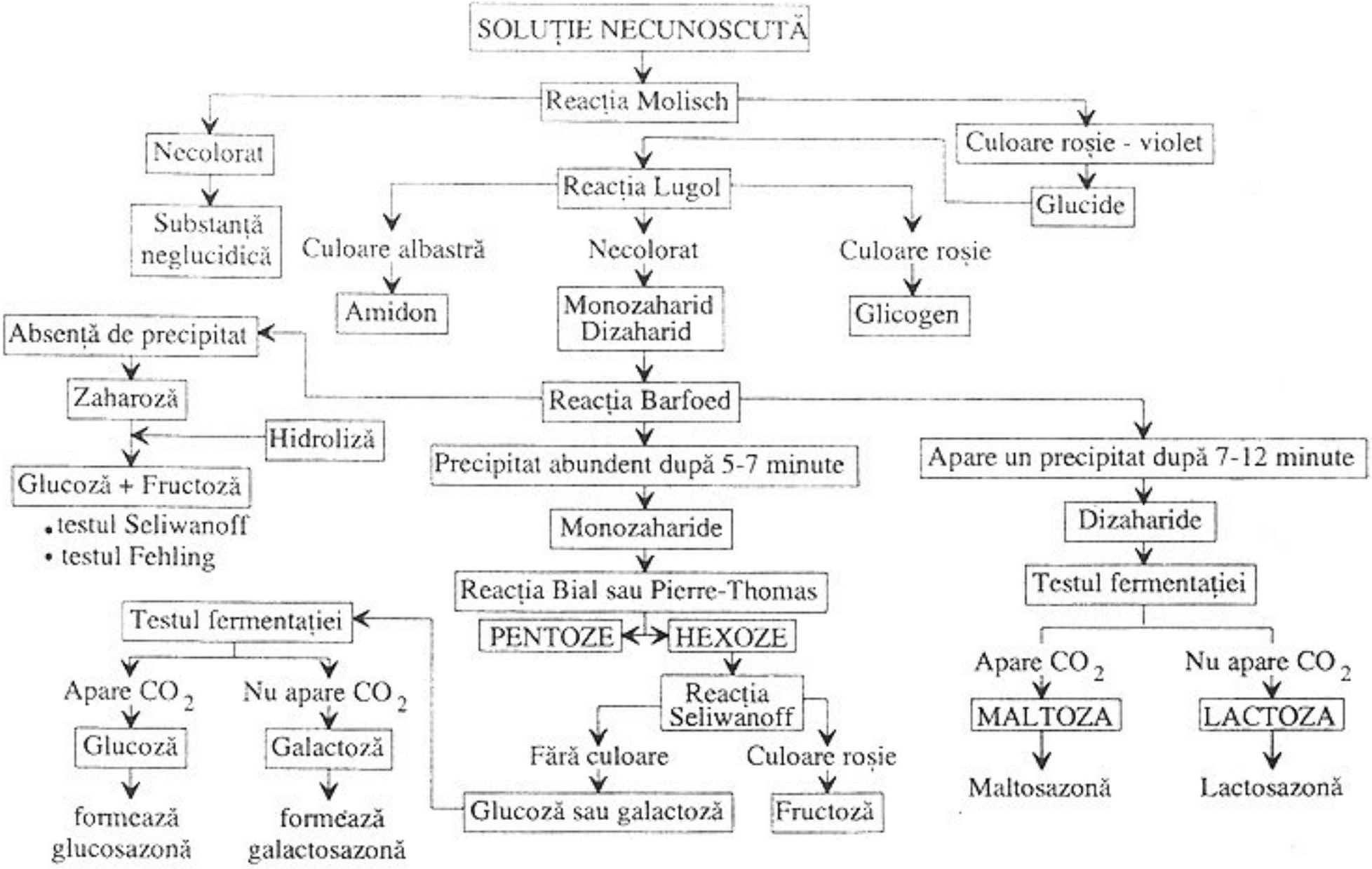
► într-un balon cotat de 100 cm^3 se introduc 20 ml soluție de amidon, 0,5 ml HCl concentrat, 0,5 ml apă distilată;

► se încălzește pe baia de apă;

► într-un stativ cu 10 eprubete numerotate de la 1 - 10 se vor colecta probe de hidrolizat la intervalele de timp specificate în tabelul V.8., pe care se vor practica reacțiile Fehling și Lugol.

V.3.8. ANALIZA UNUI AMESTEC DE GLUCIDE

În cazul unui amestec heterogen, așa cum putem întâlni într-un mediu lichid biologic, sau un extract tisular, succesiunea etapelor în urma cărora se ajunge la decizia finală este prezentată în schema V.3.8.


SOLUȚIE NECUNOSCUTĂ
Reacția Molisch
Necolorat
Culoare roșie - violet
Glucide
Substanță neglucidică
Reacția Lugol
Culoare albastră
Necolorat
Culoare roșie
Amidon
Monozaharid Dizaharid
Glicogen
Absență de precipitat
Zaharoză
Hidroliză
Glucoză + Fructoză
• testul Seliwanoff
• testul Fehling
Reacția Barfoed
Precipitat abundent după 5-7 minute
Apare un precipitat după 7-12 minute
Monozaharide
Dizaharide
Reacția Bial sau Pierre-Thomas
Testul fermentației
PENTOZE
HEXOZE
Apare CO_2
Nu apare CO_2
Reacția Seliwanoff
MALTOZA
LACTOZA
Glucoză
Galactoză
Fără culoare
Culoare roșie
Maltosazonă
Lactosazonă
formează glucosazonă
formează galactosazonă
Glucoză sau galactoză
Fructoză

Minute de la începutul hidrolizei	Produsul rezultat în urma hidrolizei	Nr. eprubetei
0	Amidon	1
		2
2 - 4	Amilodextrină	3
		4
8 - 10	Eritrodextrină	5
		6
15 - 19	Acrodextrină	7
		8
25	Maltoză	9
		10

HIDROLIZEI AMIDONULUI.

Reactivi care se adaugă	Puterea reducătoare (maltoza)	Culoarea în prezența soluției Lugol
• Fehling 1 ml; • hidrolizat 1 ml; • NaOH 5% 1 ml.	–	
• soluție Lugol 1 pic.; • hidrolizat 1 ml.		albastră
• reactiv Fehling 1 ml; • hidrolizat 1 ml; • NaOH 5% 1 ml.	1%	
• soluție Lugol 1 pic.; • hidrolizat 1 ml.		violetă
• reactiv Fehling 1 ml; • hidrolizat 1 ml; • NaOH 5% 1 ml.	2 - 3%	
• soluție Lugol 1 pic.; • hidrolizat 1 ml.		roșie
• reactiv Fehling 1 ml; • hidrolizat 1 ml; • NaOH 5% 1 ml.	10%	
• soluție Lugol 1 pic.; • hidrolizat 1 ml.		incoloră
• reactiv Fehling 1 ml; • hidrolizat 1 ml; • NaOH 5% 1 ml.	100%	
• soluție Lugol 1 pic.; • hidrolizat 1 ml.		incoloră

V.4. LIPIDE

V.4.1. GENERALITĂȚI

Lipidele organismului uman și, în general, ale tuturor organismelor superioare, reprezintă o clasă heterogenă de biomolecule caracterizate prin următoarele trăsături generale:

- rezultă prin combinarea acizilor grași cu diverși alcooli, între care se realizează legături covalente de tip **ester** sau **amidă** substituită;
- conțin în molecula lor **radicali de acizi grași** constituiți din catene lungi de atomi de carbon, care le conferă un caracter **hidrofob apolar**;
- caracterul hidrofob apolar le conferă proprietatea de a fi insolubile în mediu apos;
- caracterul hidrofob apolar le conferă proprietatea de a fi solubile în solvenți nepolari (benzen, eter, tetraclorură de carbon, cloroform);
- gradul variat de solubilitate a lipidelor în diferiți solvenți nepolari sau amestecuri de solvenți permite fracționarea lor selectivă.

Lipidele se clasifică în două mari categorii:

- **lipide simple,** în compoziția cărora intră C, H, O;
- **lipide complexe,** în compoziția cărora intră C, H, O, N, P, S.

În cele ce urmează, vor fi prezentate câteva din proprietățile chimice ale lipidelor și anume:

- identificarea lipidelor totale;
- prepararea și proprietățile săpunurilor;
- caracterizarea acizilor grași prin indicii de saponificare, aciditate și de iod;
- reacții de identificare a colesterolului;
- identificarea acizilor biliari.

TABELUL V.9. CLASIFICAREA LIPIDELOR.

<table>
<tr><th>Tipul de lipide</th><th colspan="2">Clase de lipide</th></tr>
<tr><td>LIPIDE SIMPLE
conțin
- C, H, O -</td><td colspan="2">■ acilgliceroli (esteri ai glicerolului);
■ ceride (esteri ai alcoolilor alifatici superiori);
■ steride (esteri ai sterolilor);</td></tr>
<tr><td rowspan="5">LIPIDE COMPLEXE
conțin
- C, H, O, N, P, S -</td><td colspan="2">I. GLICEROFOSFOLIPIDE.
A. Glicerofosfolipide cu azot.
■ lecitine;
■ serincefaline;
■ cefaline;
■ plasmalogeni;
B. Glicerofosfolipide fără azot.
■ acizi fosfatidici;
■ inozitolfosfatide;
■ cardiolipine;</td></tr>
<tr><td colspan="2">II. SFINGOLIPIDE.</td></tr>
<tr><td>■ sfingomieline;</td><td>[conțin fosfor]</td></tr>
<tr><td>■ ceramide;
■ cerebrozide;
■ sulfatide;
■ gangliozide.</td><td>[nu conțin fosfor]</td></tr>
</table>

V.4.2. IDENTIFICAREA LIPIDELOR TOTALE

Principiul reacției. Prin hidroliză la cald, în mediu de acid sulfuric, lipidele totale pun în libertate acizi grași care reacționează cu fosfovanilina, formând un compus colorat în roșu violaceu.

Mecanismul reacției implică mai multe etape:

► la fierbere cu H_2SO_4 concentrat, lipidele sunt hidrolizate cu formare de acizi grași și alcooli corespunzători fiecărui tip în parte:

Triacilgliceroli
Glicerofosfolipide $\longrightarrow$ $R-(CH_2)_n-CH_2-COOH$ +
Steride

$+ R-(CH_2)_n-CH=CH-COOH$ + Glicerol + Steroli

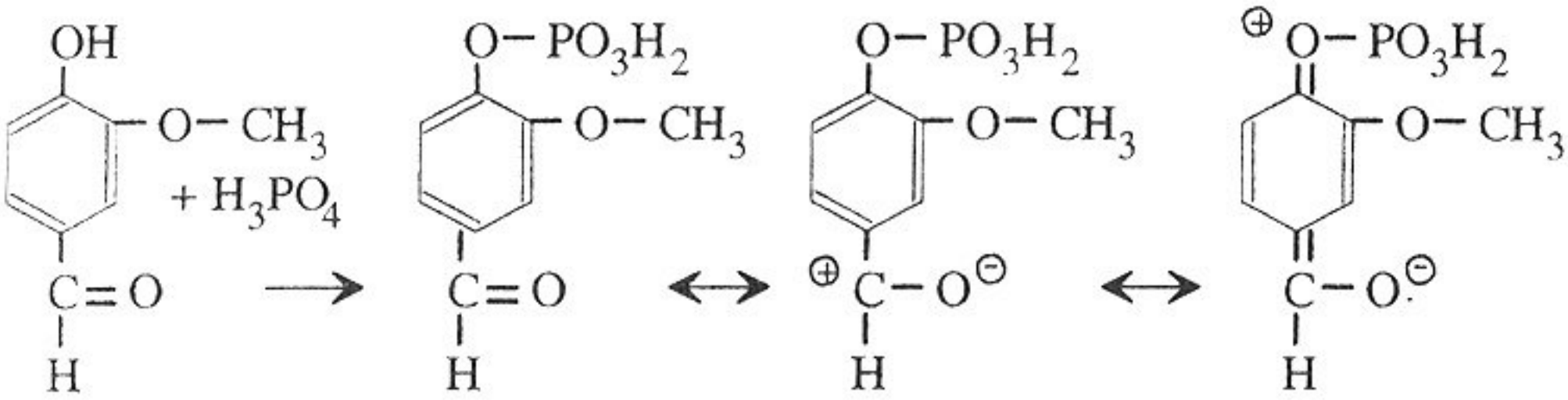
► acizii grași nesaturați rezultați prin hidroliza acilglicerolilor, fosfolipidelor și colesterolului esterificat, acceptă la dubla legătură un proton (H^+) de la H_2SO_4, formând un ion de carboniu:

$$\underset{\text{acid gras saturat}}{R-(CH_2)_n-CH_2-CH_2-COOH} \xrightarrow[-H_2O]{\substack{H_2SO_4 \\ -H_2SO_3}} \underset{\text{acid gras nesaturat}}{R-(CH_2)_n-CH=CH-COOH}$$

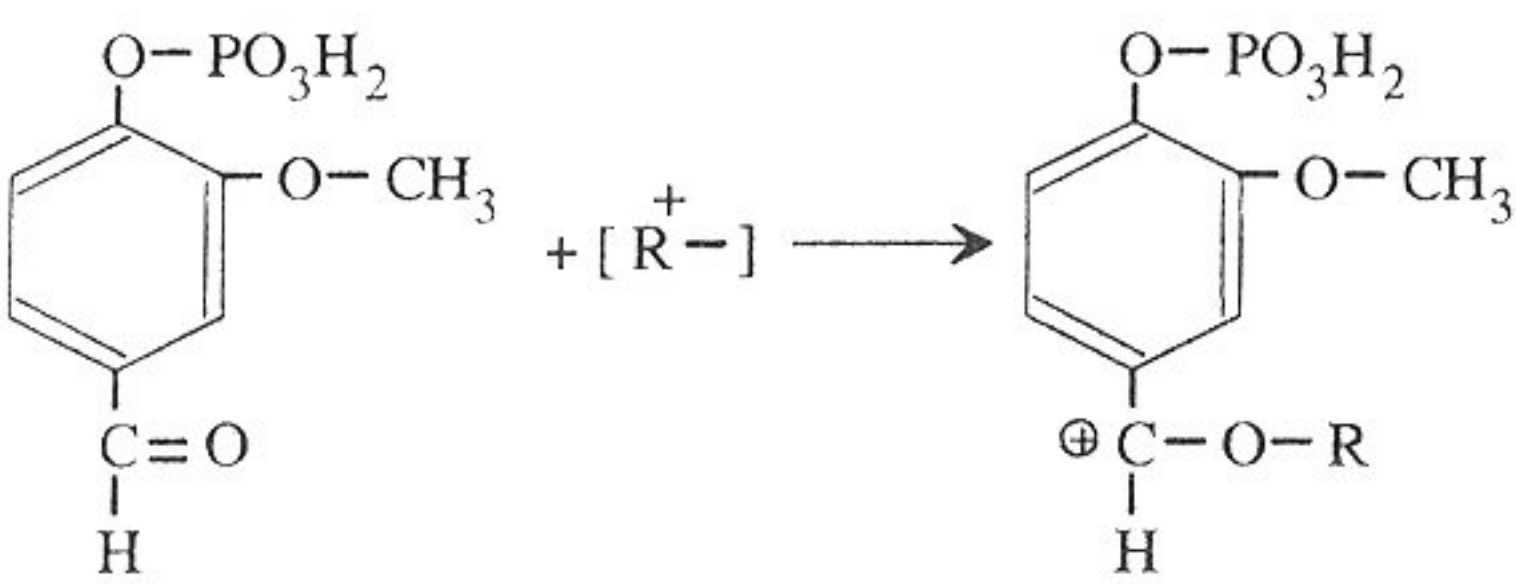
$$H_2SO_4 \rightleftharpoons H^+ + HSO_4^-$$

$$R-(CH_2)_n-CH=CH-COOH + H^+ \longrightarrow R-(CH_2)_n-\overset{+}{C}H-CH_2-COOH$$

► acidul fosforic sau fosfatul (KH_2PO_4) reacționează cu vanilina pentru a forma un ester fosforic:



► carbocationul format [$-R^+$] reacționează cu gruparea carbonil a fosfovanilinei, formând un compus colorat în roșu violaceu:



Deoarece intensitatea colorației obținute este proporțională cu concentrația acizilor grași nesaturați, respectiv cu concentrația lipidelor totale din ser, reacția poate fi folosită ca metodă cantitativă pentru dozarea lipidelor totale.

Reactivi:

- soluție cloroformică de trioleină (sau ulei);
- H_2SO_4 concentrat;
- soluție de **fosfovanilină**: într-un balon cotat de 100 ml, 6 g KH_2PO_4 se dizolvă în apă distilată, se adaugă 0,3 g vanilină (se dizolvă la cald) și se aduce la 100 ml cu apă distilată.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduce o picătură de soluție cloroformică de trioleină (sau ulei);

► se adaugă aproximativ 1 ml H_2SO_4 concentrat;

► se introduce eprubeta într-o baie de apă la fierbere, timp de 20 de minute;

► după acest interval de timp în care se petrece reacția de hidroliză a lipidelor totale, se scoată eprubeta și se răcește brusc;.

► într-o altă eprubetă se măsoară 1 - 2 ml din soluția de vanilină peste care se adaugă cu atenție, picătură cu picătură, din soluția conținând lipide totale;

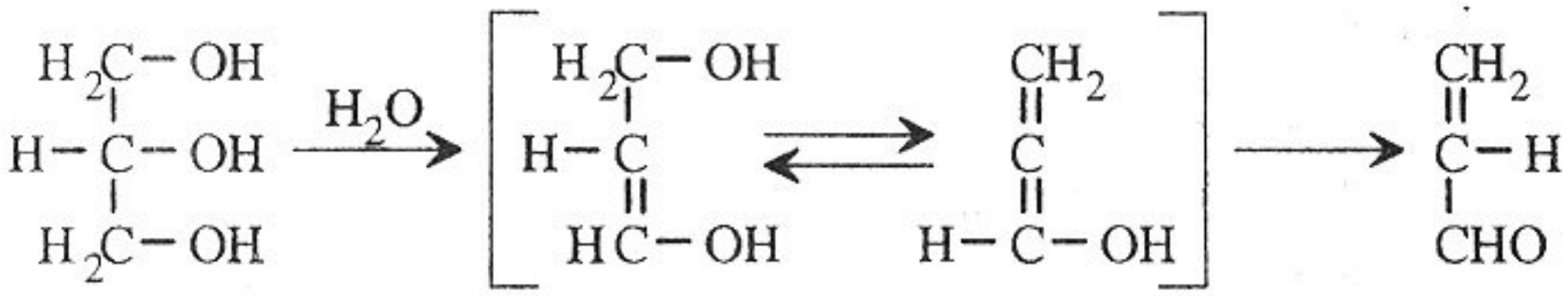
► se agită puternic până ce soluția se colorează în roșu violaceu.

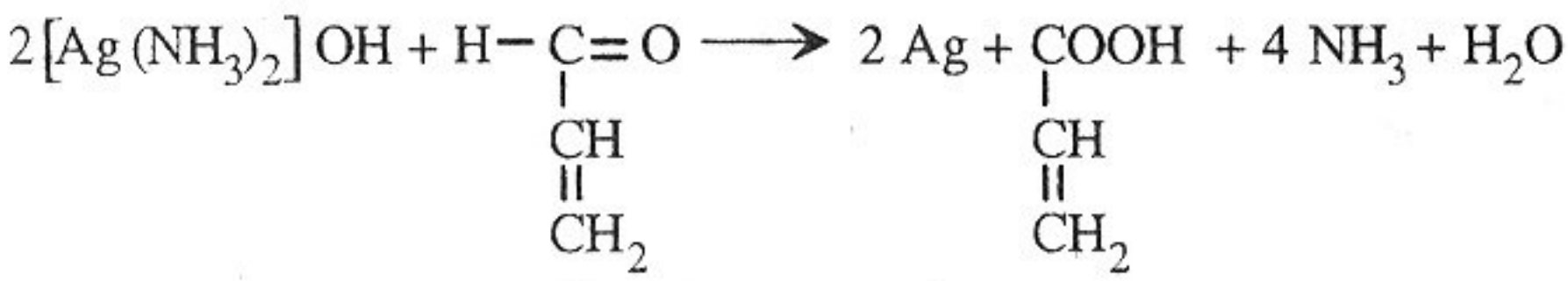
V.4.3. REACȚII DE IDENTIFICARE A GLICEROLULUI

Glicerolul este un lichid siropos, incolor, cu gust dulceag, ușor solubil în apă și alcool. Este miscibil cu apa în orice proporție și foarte higroscopic. Cristalizează greu și are o densitate de 1,2610 la 15ºC.

V.4.3.1. DESHIDRATAREA GLICEROLULUI

Principiu. În prezența sulfatului acid de potasiu ($KHSO_4$), la cald, glicerolul suferă un proces de deshidratare, în urma căruia rezultă **propenalul** (aldehida acrilică) sau **acroleina**, un lichid cu miros înecăcios și iritant. Acroleina rezultă și prin utilizarea repetată a uleiului în gospodărie. Acroleina reduce azotatul de argint amoniacal (reactiv Tollens) la argint metalic.





Reactivi:

- glicerol sau Oleum Helianthi;
- sulfat acid de potasiu cristalizat;
- soluție de hidroxid diamoniaco argentic (reactiv Tollens).

Tehnica de lucru:

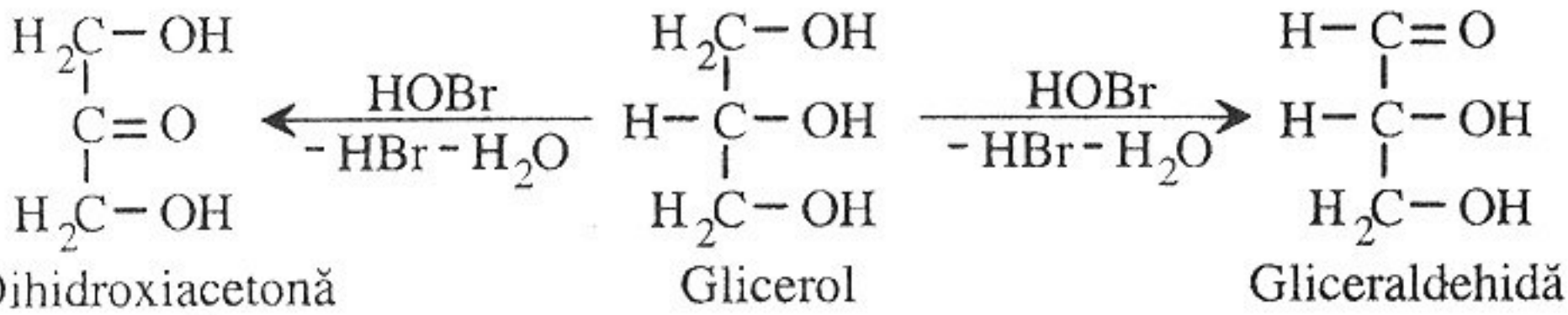
► într-o eprubetă se introduc 4 - 5 picături Oleum Helianthi sau glicerol și 0,2 g sulfat acid de potasiu;

► se încălzește la flacără până la apariția unui fum alb cu miros iritant, datorat acroleinei;

► dacă se apropie de gura eprubetei o hârtie de filtru îmbibată cu azotat de argint amoniacal, apare o pată neagră rezultată prin reducerea sării de argint la argint metalic.

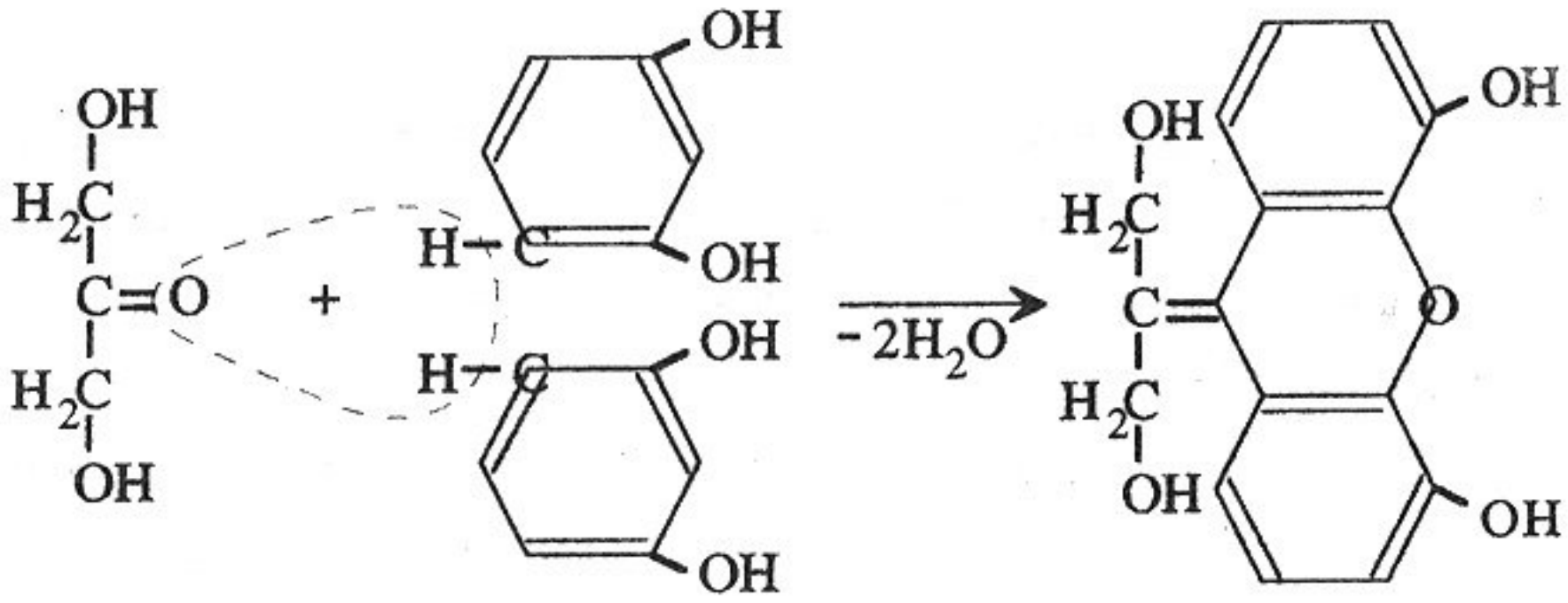
V.4.3.2. OXIDAREA GLICEROLULUI

Prin oxidarea cu apă de brom a glicerolului rezultă gliceraldehidă și dihidroxiacetonă.

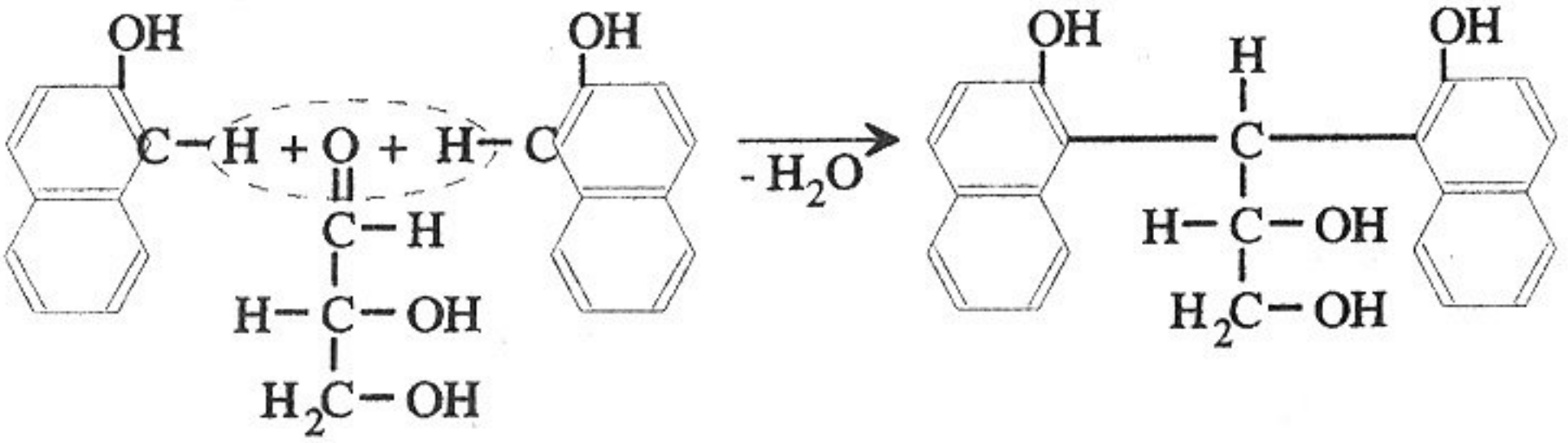


Dihidroxiacetonă — Glicerol — Gliceraldehidă

- dihidroxiacetona, în mediu de acid sulfuric, se condensează cu rezorcina și dezvoltă o colorație roșie:



◆ gliceraldehida, în prezența acidului sulfuric și a β-naftolului, dă un complex de culoare verde smarald:



Reactivi:

◆ glicerol; ◆ soluție apoasă de brom;

◆ soluție rezorcină 0,3% în H_2SO_4 concentrat;

◆ soluție β-naftol 0,3% în H_2SO_4 concentrat.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc 2 - 3 picături de glicerol și 10 ml soluție de brom;

► eprubeta se fierbe timp de 30 de minute pe o baie de apă, iar dacă bromul este în exces se continuă fierberea până la îndepărtarea acestuia;

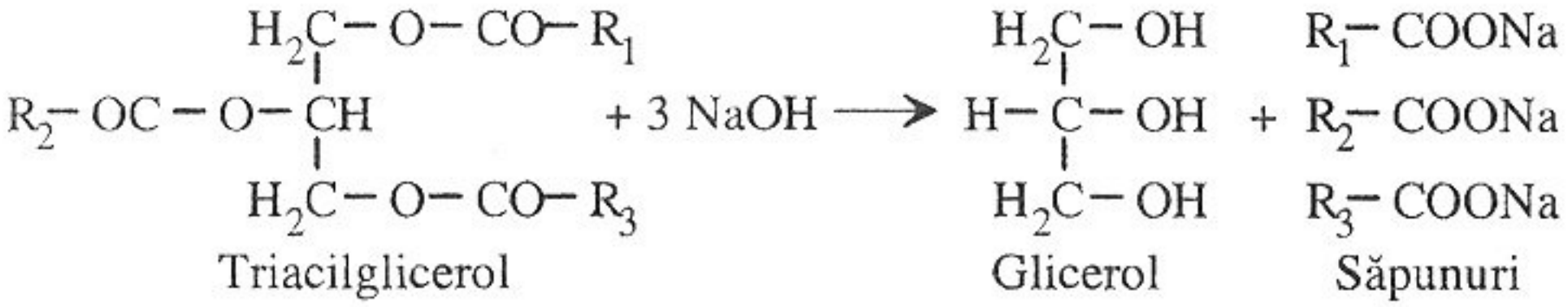
► în două eprubete se introduc câte 4 ml din soluția de glicerină oxidată;

► într-una din eprubete se introduc cu atenție 2 ml soluție rezorcină; apare un inel roșu, datorat prezenței dihidroxiacetonei;

► în cea de a doua eprubetă se introduc 2 ml de soluție β-naftol; apare un inel verde datorat aldehidei glicerice.

V.4.4. PREPARAREA ȘI PROPRIETĂȚILE SĂPUNURILOR

Principiul reacției. Acilglicerolii, în prezență de NaOH sau KOH, se scindează hidrolitic la nivelul legăturii ester, în glicerol și acizii grași constituenți. În mediul alcalin existent, acizii grași eliberați formează sărurile de sodiu sau de potasiu, denumite **săpunuri**. Această reacție de hidroliză alcalină cu formare de săpunuri poartă denumirea de **saponificare**. Pentru cazul general al unui triacilglicerol, reacția este următoarea:



Triacilglicerol Glicerol Săpunuri

Săpunurile metalelor alcaline sunt solubile în apă, în timp ce ale metalelor alcalino- pământoase sunt insolubile în apă.

Această proprietate poate fi pusă în evidență prin tratarea unei soluții de săpun de sodiu cu săruri de calciu, când rezultă un precipitat alb (săpunul de calciu).

$$2\ R - COONa + CaCl_2 \rightarrow (R - COO)_2Ca + 2\ NaCl$$

Soluțiile de săpun sunt **soluții coloidale**, faza dispersată fiind reprezentată de agregate moleculare rezultate prin asocierea ionilor R - COO^- (micelii). La adăugarea unei cantități mai mari de ioni de K^+ sau de Na^+, săpunurile sunt precipitate din soluții printr-un proces de **deshidratare** parțială a miceliilor.

Prin încălzirea cu acizi a soluțiilor de săpunuri, se formează acizi grași liberi, conform reacției:

$$R - COONa + CH_3 - COOH \rightarrow R - COOH + CH_3COONa$$

Acizii grași rezultați nu sunt solubili în mediu apos; de aceea determină apariția unei turbidități, a unui strat uleios.

Săpunurile sunt agenți tensioactivi și sunt utilizați ca **agenți de spălare**, agenți de udare, emulgatori.

În experiențele prezentate în cele ce urmează vor fi ilustrate câteva din proprietățile săpunurilor.

Reactivi:

◆ ulei de soia sau de floarea soarelui (Oleum Helianthi);

◆ soluție alcoolică de NaOH (alcool sodat) conținând 20% NaOH în alcool etilic 60%;

◆ acid acetic glacial; ◆ soluție saturată de $CaCl_2$;

◆ soluție saturată de NaCl.

Tehnica de lucru:

▪ **Obținerea săpunului.**

► într-o eprubetă se introduc 3 - 4 picături de ulei și 3 - 4 ml soluție alcoolică de NaOH;

► se încălzește pe baie de apă la fierbere timp de 8 - 10 minute până se constată dispariția uleiului;

► se adaugă 10 - 15 ml apă distilată, se agită, iar soluția se utilizează pentru experiențele următoare.

▪ **Precipitarea săpunurilor cu NaCl.**

► într-o eprubetă se adaugă 2 - 3 ml soluție de săpun;

► se adaugă un volum egal de soluție saturată de NaCl;

► săpunul se separă din soluție sub formă de precipitat.

▪ **Precipitarea săpunurilor cu $CaCl_2$.**

► într-o eprubetă se adaugă 2 - 3 ml soluție de săpun de sodiu;

► se adaugă un volum egal de soluție saturată de $CaCl_2$;

► se formează un precipitat voluminos de săpun de calciu.

▪ **Descompunerea săpunurilor.**

► într-o eprubetă se introduc 2 - 3 ml din soluția de săpun;

► se adaugă un volum egal de acid acetic glacial;

► soluția se încălzește pe baia de apă;

► acizii grași se separă sub forma unui inel uleios.

V.4.5. CARACTERIZAREA ANALITICĂ A LIPIDELOR

Lipidele se pot caracteriza analitic prin proprietățile acizilor grași componenți, concretizate prin anumiți **indici**. Acești indici reprezintă valori numerice pe baza cărora se pot obține date referitoare la :

- natura și masa moleculară medie a acizilor grași care intră în structura lipidelor;
- gradul de nesaturare al lipidelor;
- starea de prospețime a lipidelor alimentare.

V.4.5.1. DETERMINAREA INDICELUI DE SAPONIFICARE

Definiție: Indicele de saponificare (indice Köttstorfer) reprezintă cantitatea de hidroxid de potasiu (KOH), exprimată în miligrame, necesară pentru a saponifica 1 g grăsime.

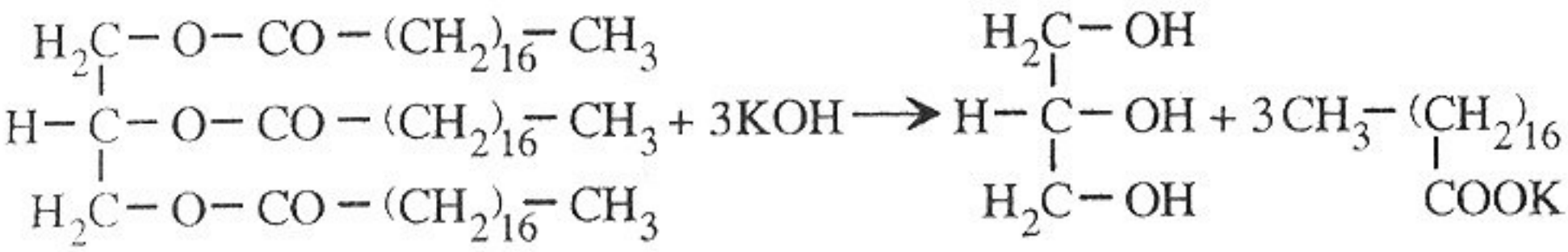
Saponificarea acilglicerolilor constituie procesul chimic de hidroliză a acestora în mediu puternic alcalin, proces prin care legătura ester este scindată cu punerea în libertate a glicerolului și sărurilor acizilor grași (săpunuri).

Indicele de saponificare permite aprecieri asupra masei moleculare medii a acizilor grași constituenți ai acilglicerolilor.

Valoarea indicelui de saponificare este **invers proporțională cu masa moleculară a acizilor grași** din compoziția triacilglicerolilor.

O valoare **mică** a indicelui I_s indică existența unor acizi grași cu **masă moleculară mare**, iar o valoare **mare** a I_s denotă prezența unor acizi grași cu **mase moleculare mici.**

Exemplul 1. Saponificarea tristearinei (M = 890)



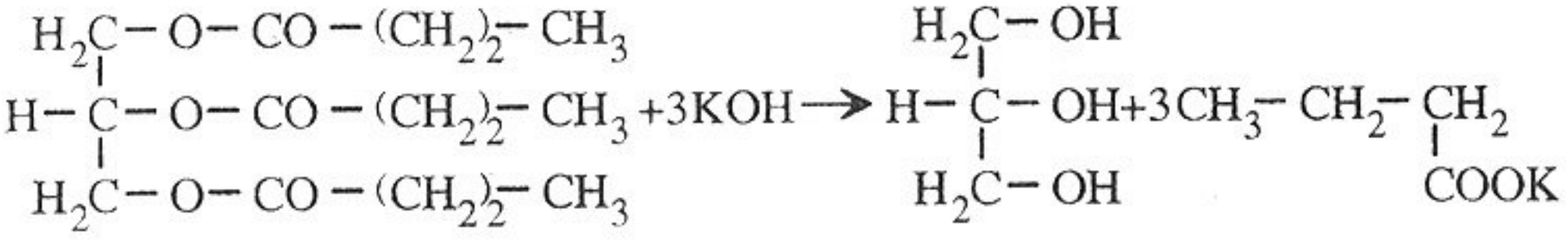
Pentru saponificarea unui mol de tristearină sunt necesari 3moli KOH (3 x 56 = 168 g KOH).

890 g tristearină ..... 168 g KOH

1 g tristearină ..... X g KOH

X = 0,188 g

Exemplul 2. Saponificarea tributirinei (M = 302).



Pentru saponificarea unui mol de tributirină sunt necesari 3 moli KOH (3 x 56 = 168 g KOH)

302 g tributirină ..... 168 g KOH

1 g tributirină ..... X g KOH

X = 0,571 g

Principiul metodei. O cantitate cunoscută de grăsime (triacilgliceroli) se saponifică în prezență de hidroxid de potasiu în exces. Excesul de KOH se titrează cu o soluție de acid clorhidric de titru cunoscut, în prezență de fenolftaleină. Se determină prin diferență cantitatea de KOH consumată la saponificare care, conform definiției, se raportează la 1 g de grăsime.

Reactivi:

- Oleum Helianthi (ulei);
- soluție alcoolică de KOH 0,5 n;
- soluție de HCl 0,5 n;
- soluție de fenolftaleină 1% în alcool etilic.

Tehnica de lucru:

► într-un pahar de titrare de 100 cm^3, la care se poate adapta un refrigerent cu reflux, se introduce o cantitate precis cântărită (**s**) de ulei;

► se adaugă 10 cm^3 soluție alcoolică de KOH 0,5 n exact măsurată;

► se atașează refrigerentul la paharul de titrare, care se introduce într-o baie de apă aflată la fierbere timp de 30 minute;

► după acest interval de timp, în care s-a petrecut reacția de saponificare, se scoate refrigerentul;

► se adaugă 2 - 3 picături de fenolftaleină care dezvoltă o coloratie roșie violetă;

► se titrează excesul de KOH cu o soluție de HCl 0,5 n până la dispariția colorației roșu violet;

► se citește la biuretă volumul de HCl 0,5 n utilizat la titrare (V_p);

► în paralel, se efectuează în aceleași condiții determinarea unei probe martor care nu conține ulei (V_m).

Calculul. Cantitatea de KOH consumată pentru saponificarea probei de grăsime (**s**) se află aplicând relația:

$$G = (V_m - V_p)_{HCl} \cdot F_{HCl} \cdot n \cdot mE_{KOH} \cdot 10^3 \text{ mg KOH}$$

în care: V_m = volumul HCl 0,5 n folosit pentru titrarea martorului;

V_p = volumul HCl 0,5 n folosit pentru titrarea probei;

$(V_m - V_p)$ = reprezintă ml HCl 0,5 n corespunzători volumului de KOH 0,5 n consumat la saponificarea probei de grăsime;

F_{HCl} = reprezintă factorul de corecție al soluției de HCl 0,5 n;

n = reprezintă normalitatea (0,5); $mE_{KOH} = 0,056$.

Raportând cantitatea de KOH (G) la 1 g grăsime, se află indicele de saponificare (I_s).

s g grăsime ..... G mg KOH

1 g grăsime ..... I_s

Rezultă: $I_s = \frac{G}{s} = \frac{(V_m - V_p)_{HCl} \cdot F_{HCl} \cdot 0,5 \cdot 0,056 \cdot 10^3}{s}$ mg KOH

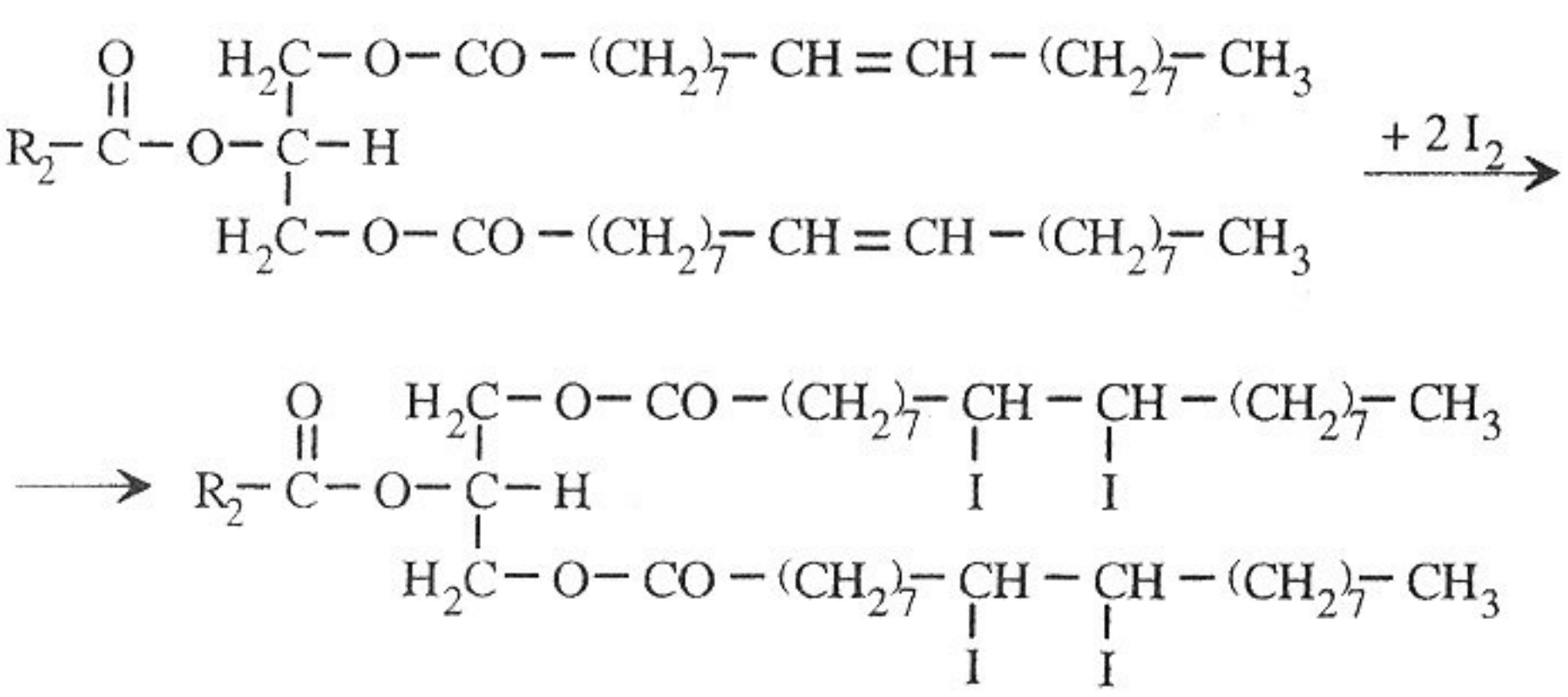
$$I_s = \frac{(V_m - V_p)_{HCl} \cdot F_{HCl} \cdot 28}{s} \text{ mg KOH}$$

V.4.5.2. DETERMINAREA INDICELUI DE IOD

Definiție: Indicele de iod (I_i) reprezintă cantitatea de iod exprimată în grame, care se adiționează la 100 g grăsime.

Valoarea indicelui de iod furnizează indicații asupra gradului de nesaturare al unei grăsimi, respectiv asupra proporției de acizi nesaturați care intră în structura acesteia.

Principiul metodei. O cantitate de ulei dizolvată în tetraclorura de carbon (CCl_4) se tratează cu o cantitate cunoscută și în exces de iod. Acizii grași nesaturați din constituția triacilglicerolilor adiționează iodul la dublele legături.



Cantitatea de iod în exces se titrează cu o soluție de tiosulfat de sodiu, în prezența amidonului ca indicator.

$$2\ Na_2S_2O_3 + I_2 \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2\ NaI$$

Reactivi:

- ulei de floarea soarelui; - tetraclorură de carbon;
- reactiv Hanus (monobromură de iod): 13 g iod metalic și 8 g brom se dizolvă în 100 ml acid acetic glacial și se completează la 1000 cm^3 cu apă distilată;
- soluție de KI 2%; - soluție $Na_2S_2O_3$ 0,05 n;
- soluție de amidon 1%.

Tehnica de lucru. Se urmărește schema de lucru de mai jos, utilizând două pahare Erlenmeyer cu dop rodat de 100 ml probă (P) și martor (M).

Reactivi și operații	Probă	Martor
► ulei (g);	s (2 pic.)	–
► CCl_4 (ml);	1	1
► reactiv Hanus (ml);	2	2
► se astupă baloanele cu dop rodat, se agită și se lasă în repaus la întuneric 30 de minute, timp în care o anumită cantitate de iod se adiționează la dublele legături ale acizilor grași;		
► KI 2% ml	10 ml	10 ml
► se agită și se titrează cu $Na_2S_2O_3$ 0,05 n până la apariția unei colorații galbene;		
► amidon 1% ml	1	1
► se continuă titrarea până la dispariția culorii albastre;		
► $Na_2S_2O_3$ 0,05 n.	V_p	V_m

Calculul. Cantitatea de iod (G) adiționată la proba de grăsime (s) se află aplicând relația:

$$G = (V_m - V_p)_{Na_2S_2O_3} \cdot F_{Na_2S_2O_3} \cdot n \cdot mE_{I_2} \cdot g \text{ iod}$$

în care: V_m = ml $Na_2S_2O_3$ 0,05 n folosiți la titrarea martorului;

V_p = ml $Na_2S_2O_3$ 0,05 n folosiți la titrarea probei;

(V_m - V_p) = ml $Na_2S_2O_3$ 0,05 n corespunzători volumului soluțieide iod adiționat;

$F_{Na_2S_2O_3}$ = factorul de corecție al soluției de tiosulfat de sodiu;

n = normalitatea soluției (0,05);

mE_{I_2} = 0,127 (miliechivalentul iodului).

Indicele de iod (I_i) se calculează raportând cantitatea de iod la 100 g grăsime:

s g grăsime ..... G g I_2

100 g grăsime ..... I_i

$$I_i = \frac{G}{s} \cdot 100 = \frac{(V_m - V_p)_{Na_2S_2O_3} \cdot F_{Na_2S_2O_3} \cdot 0{,}05 \cdot 0{,}127 \cdot 100}{s}$$ sau

$$I_i = \frac{(V_m - V_p)_{Na_2S_2O_3} \cdot F_{Na_2S_2O_3} \cdot 0{,}635}{s}$$ g I_2

Indicele de iod este important pentru aprecierea calității uleiurilor sicative, caracterizate de o cifră de iod de peste 130. Uleiul de in are o cifră de iod cuprinsă între 170-180.

V.4.5.3. DETERMINAREA INDICILOR DE PEROXID ȘI DE ACIDITATE

Râncezirea grăsimilor reprezintă un proces complex de degradare biochimică, prin care acestea se denaturează și își pierd proprietățile native. Factorii care contribuie la râncezirea lipidelor sunt:

- **lumina;** - **aerul;** - **umezeala;** - **căldura;**
- **acțiunea unor bacterii.**

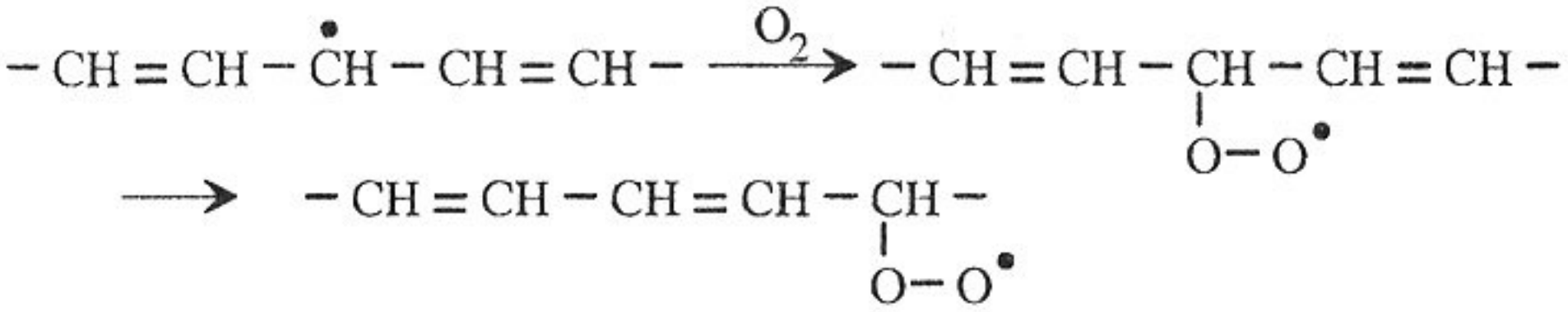
Procesul de râncezire constă în degradarea pe cale oxidativă și hidrolitică a acizilor grași **nesaturați**, care se transformă inițial în **peroxizi** și **hidroperoxizi**; ulterior aceștia se transformă în acizi carboxilici inferiori, aldehide, cetone, alcooli. Produșii de degradare determină gustul și mirosul caracteristic neplăcut al grăsimilor râncede.

Mecanismul de reacție implică următoarele etape:

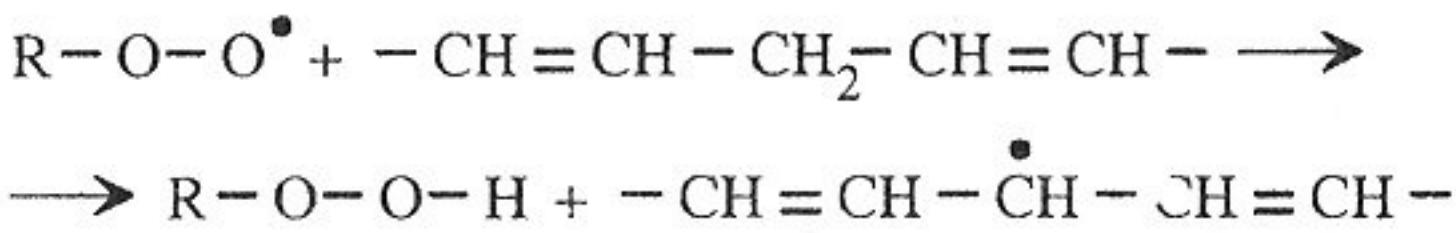
➢ în prezența aerului, luminii, căldurii, se generează radicali liberi prin extragerea unui atom de hidrogen de la o grupare metilen ($-CH_2-$) activată de prezența unor duble legături învecinate din structura unui acid gras nesaturat:

$$\underset{\text{lanțul unui acid gras}}{-CH=CH-CH_2-CH=CH-} \xrightarrow{h\nu,\ t^o} \underset{\text{radical liber}}{-CH=CH-\dot{C}H-CH=CH-}$$

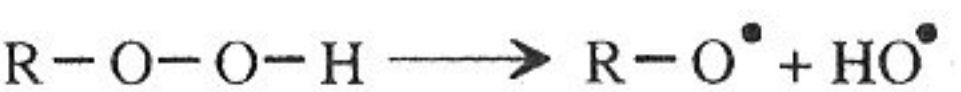
➢ radicalul liber format fixează o moleculă de oxigen, rezultând un radical peroxidic:



➢ în etapa următoare, radicalul peroxidic, R - O - O˙, extrage un atom de hidrogen din catena unui alt acid gras, rezultând astfel un hidroperoxid (R - O - O - H):



➢ hidroperoxidul format se poate descompune autocatalitic în doi radicali liberi:

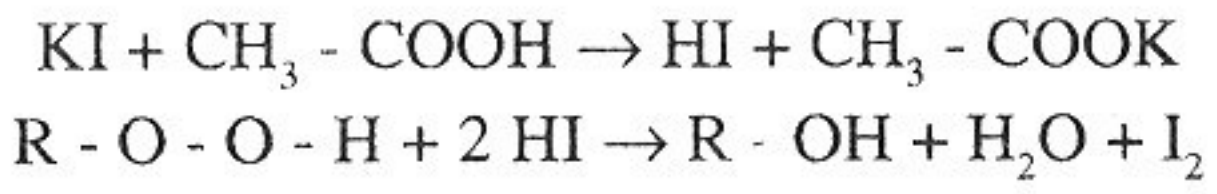


➢ peroxizii formați exercită acțiune oxidantă asupra acizilor grași formând aldehide, cetone, alcooli, acizi.

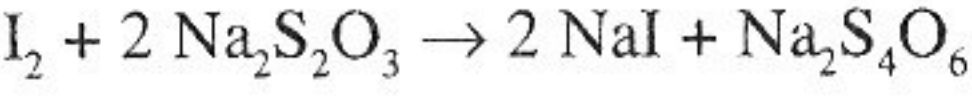
Gradul de prospețime al unei grăsimi se apreciază prin evaluarea **indicelui de peroxid** și **indicelui de aciditate.**

Definiție: Indicele de peroxid reprezintă numărul de miliechivalenți de peroxid conținuți în 1000 g grăsime.

Principiul metodei. Peroxizii existenți într-o cantitate cântărită de grăsime oxidează, în mediu acid, ionii de iod la iod elementar.



Iodul rezultat se determină cantitativ prin titrare cu o soluție de tiosulfat de sodiu, în prezența amidonului ca indicator.



Reactivi:

- ◆ amestec de trei părți CH_3COOH și două părți $CHCl_3$;
- ◆ soluție de KI 10%; ◆ soluție de $Na_2S_2O_3$ 0,1 n;
- ◆ soluție de amidon 1%.

Tehnica de lucru:

► într-un pahar de titrare se introduc 2 g ulei de soia sau floarea soarelui;

► se adaugă 5 ml amestec (CH_3COOH + $CHCl_3$) și se agită bine;

► se adaugă 1 ml KI 10% și se lasă în repaus timp de 1 minut;

► se adaugă 20 ml apă distilată;

► se titrează cu $Na_2S_2O_3$ 0,1 n, în prezența amidonului ca indicator;

► se notează volumul de tiosulfat de sodiu 0,1 n (V) utilizat pentru titrarea probei de analizat.

Calculul. Conform ecuațiilor de mai jos:

$1\ E_{Na_2S_2O_3}$ ..... $1\ E_{peroxid}$

1 ml $Na_2S_2O_3$ 0,1 n ..... 0,1 $mE_{peroxid}$

V ml $Na_2S_2O_3$ 0,1 n ..... $I_{peroxid}$

Indicele de peroxid (I_p) se raportează la 1000 g grăsime:

$$I_p = \frac{V \cdot 0{,}1 \cdot 10^3}{s} mE_{peroxid} = \frac{V \cdot 10^3}{s} mE_{peroxid}$$

V = ml $Na_2S_2O_3$ 0,1 n folosiți la titrarea probei de grăsime;

s = cantitatea de grăsime luată în analiză.

Determinarea indicelui de aciditate.

Definiție: Cantitatea de hidroxid de potasiu (KOH), exprimată în miligrame, necesară pentru a neutraliza acizii grași liberi dintr-un gram de grăsime, reprezintă indicele de aciditate.

Acizii grași liberi sunt rezultați atât prin râncezire hidrolitică, cât și prin autooxidarea grăsimilor și, prin urmare, nivelul acestora permite aprecierea gradului de prospețime al grăsimilor.

Principiul metodei. Acizii grași liberi dintr-o cantitate cântărită de grăsime (**s** grame) sunt neutralizați prin titrare cu o soluție alcoolică de KOH, în prezența fenolftaleinei ca indicator.

$$R - COOH + KOH \rightarrow R - COOK + H_2O$$

Reactivi:

- soluție de KOH 0,1 n;
- soluție alcoolică de fenolftaleină 0,1%;
- alcool etilic neutralizat cu KOH 0,1 n, în prezență de fenolftaleină.

Tehnica de lucru:

► într-un pahar de titrare se introduc 5 g ulei vegetal și 20 ml alcool etilic;

► paharul se încălzește pe baia de apă la 60 - 70°C;

► se adaugă 1 - 2 picături de fenolftaleină;

► se titrează cu soluție de KOH 0,1 n până la virajul slab roz.

Calculul. Cantitatea de KOH folosită pentru neutralizarea acizilor grași liberi din proba de analizat se calculează astfel:

$$g\ KOH = V_{KOH} \times F_{KOH} \times T$$

Indicele de aciditate rezultă prin raportarea la 1 g grăsime:

$$I_a = \frac{V_{KOH} \cdot F_{KOH} \cdot 5,6}{s} \qquad mg\ KOH$$

în care: V_{KOH} = ml KOH 0,1 n folosiți la titrare;

F_{KOH} = factorul de corecție al soluției de KOH;

T = titrul soluției de KOH ($5,6 \cdot 10^{-3}$ g/ml);

s = cantitatea de grăsime luată în analiză.

V.4.6. REACȚII DE IDENTIFICARE A COLESTEROLULUI

Sterolii sunt alcooli policiclici, derivați ai ciclopentanoperhidrofenantrenului, care se esterifică cu acizi grași superiori.

Colesterolul este cel mai important sterol de origine animală care îndeplinește în organism numeroase roluri biologice. Se găsește distribuit în majoritatea țesuturilor animale și în sânge, atât în stare liberă, cât și esterificată cu acizi grași saturați și nesaturați.

În lichidele biologice se găsește în special sub formă esterificată, iar în celule sub formă neesterificată.

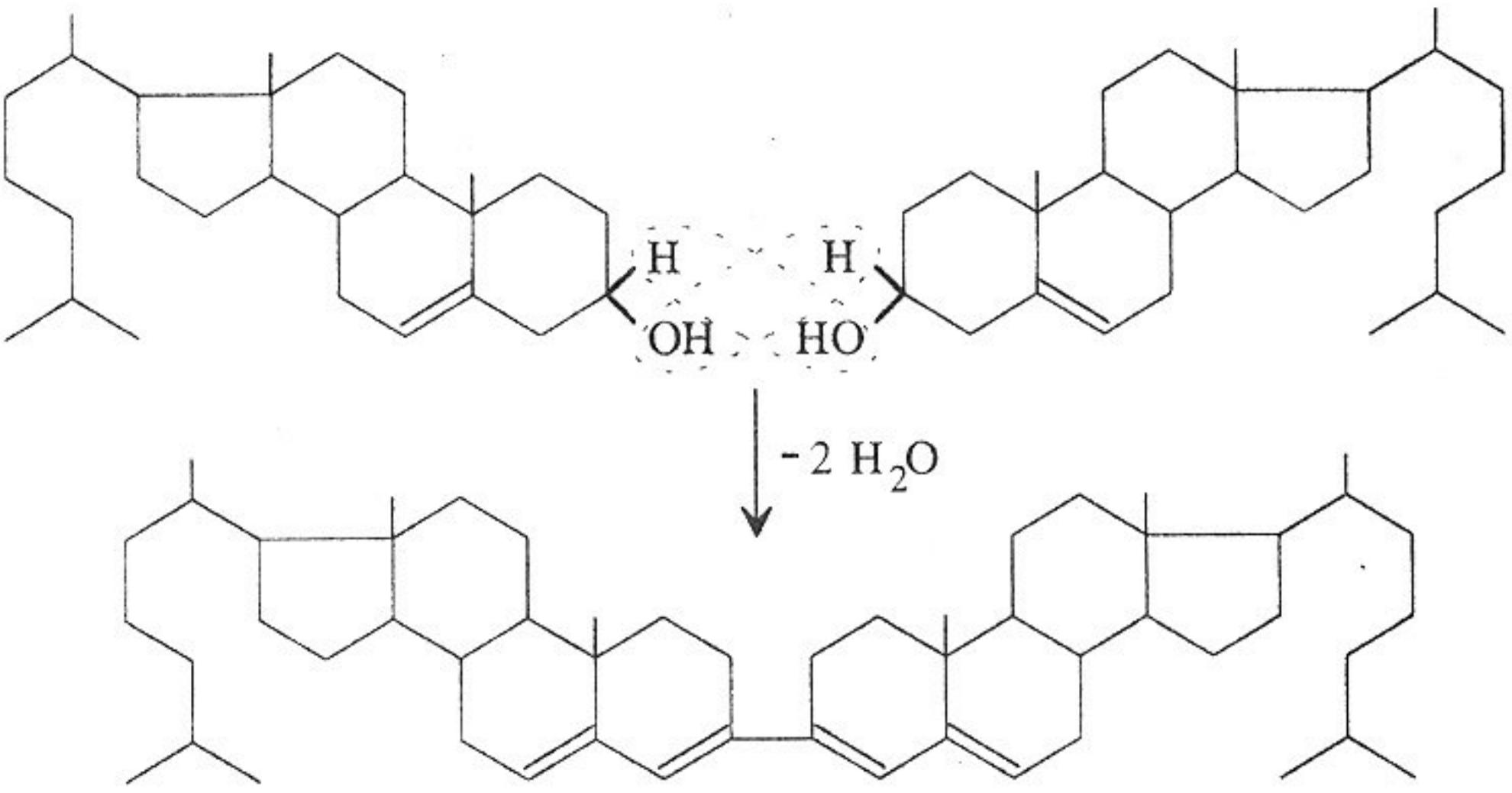
Identificarea colesterolului se bazează pe reacțiile de culoare în care sunt implicate:

- gruparea hidroxil (- OH) din poziția 3;
- prezența dublei legături din poziția 5 - 6.

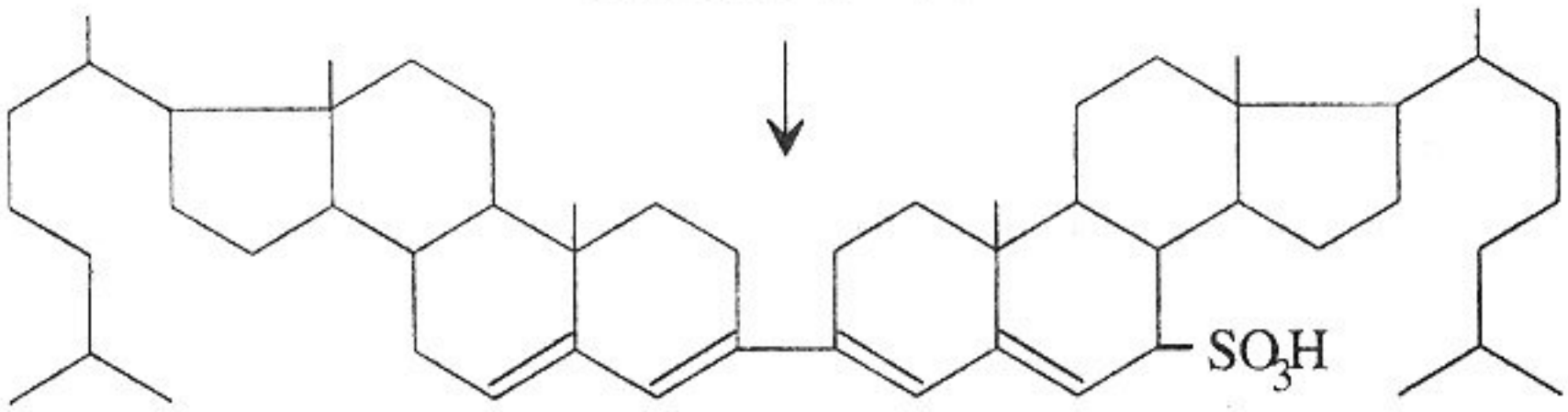
V.4.6.1. PRINCIPIUL REACȚIILOR DE IDENTIFICARE A COLESTEROLULUI

Prin acțiunea acidului sulfuric concentrat asupra colesterolului se formează hidrocarburi cu formula $C_{54}H_{88}$ denumite **biscolestandiene** care fixează una sau două grupări sulfonice:

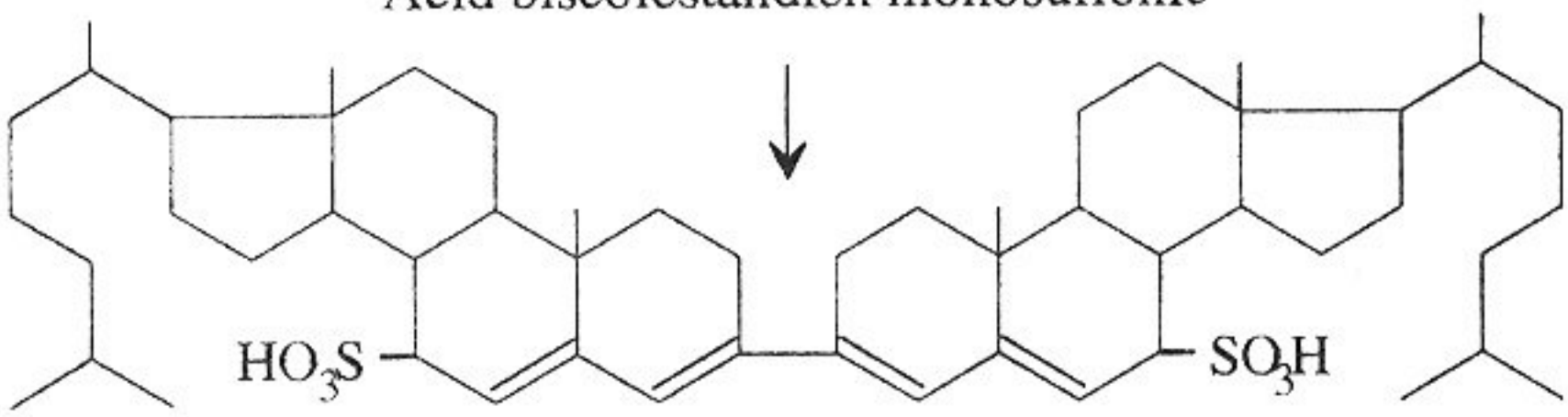
- în cazul reacției cu H_2SO_4 concentrat (reacția Salkowski) se obține derivatul disulfonic al biscolestandienei - culoare roșie;
- în cazul în care H_2SO_4 este diluat cu anhidridă acetică (reacția Liebermann - Burchardt) se obține derivatul monosulfonic al biscolestandienei - culoare verde.
- **Reacția Salkowski.** Colesterolul în soluție cloroformică, în prezența acidului sulfuric concentrat dezvoltă o culoare **roșie**;
- **Reacția Liebermann - Burchardt.** În prezența anhidridei acetice și a acidului sulfuric concentrat, colesterolul dezvoltă o suită de culori galben, portocaliu, violet, albastru și, în final, se stabilizează la **verde** sau **mov**;
- **Reacția Zak - Henly.** În prezența clorurii ferice ($FeCl_3$) și a acidului sulfuric concentrat se dezvoltă o colorație **roșie purpurie**;
- **Reacția Kurasawa - Takada - Ueda.** În prezența acidului tricloracetic și clorurii de stibiu, colesterolul dezvoltă o colorație **galbenă, galbenă portocalie** sau **roșie**.



Biscolestandiena



Acid biscolestandien monosulfonic



Acid biscolestandien bissulfonic

Reactivi:

- soluție cloroformică de colesterol 0,2%;
- acidul sulfuric concentrat;
- soluție $FeCl_3$ 5% în acid acetic glacial;
- acid tricloracetic 10%;
- soluție de $SbCl_3$ 5% în acid tricloracetic 10%.

Tehnica de lucru. În patru eprubete se vor introduce reactivii menționați mai jos:

TABELUL V.10. REACȚII DE IDENTIFICARE A COLESTEROLULUI.

Reactivi	Reacția Liebermann	Reacția Salkowski	Reacția Zak - Henly	Reacția Kurasawa
Soluție colesterol (ml)	2	2	2	2
Anhidridă acetică (ml)	1	–	–	–
H_2SO_4 conccentrat (ml)	1	1	1	–
$FeCl_3$ 5% (ml)	–	–	1	–
Acid tricloracetic (ml)	–	–	–	1
$SbCl_3$ 5% (ml)	–	–	–	1
Culoarea	verde	roșie	roșie	galbenă

V.4.7. SĂRURILE BILIARE

Principalii acizi biliari din bila mamiferelor sunt în ordine acidul **colic** și **dezoxicolic**, conjugați cu glicocolul sau cu taurina, sub forma unor săruri solubile de sodiu și potasiu (săruri biliare).

Acizii biliari conjugați și sărurile lor de sodiu și potasiu, au proprietatea de a ușura solubilizarea unor substanțe insolubile, prin formarea unor compuși coleinici și de a face posibilă absorbția lor prin mucoasa intestinală. Printre substanțele solubilizate sunt lipidele simple și vitaminele liposolubile.

Proprietatea sărurilor biliare de a emulsiona lipidele este datorată capacității lor de a scădea tensiunea superficială.

V.4.7.1. IDENTIFICAREA SĂRURILOR BILIARE

- **Reacția Hay**

Principiul reacției. Soluția apoasă a sărurilor biliare scade puternic tensiunea superficială și astfel, dacă se presară floare de sulf, aceasta va cădea la fundul eprubetei.

Reactivi:

◆ soluție de bilă sau glicocolat; ◆ floare de sulf.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc 10 - 15 ml apă distilată;

► la suprafața apei se presară floare de sulf;

► la agitare, floarea de sulf rămâne la suprafața apei;

► se adaugă câteva picături de bilă sau glicocolat de sodiu;

► floarea de sulf cade la fundul eprubetei, demonstrând scăderea tensiunii superficiale.

• **Reacția Pettenkofer.**

Principiul reacției. În prezența zaharozei sau fructozei și a acidului sulfuric concentrat, acizii biliari și sărurile lor dau o coloratie **roșie brună**, prin formarea unui complex cu furfuralul.

Reactivi:

◆ soluție de bilă sau săruri biliare 0,2%;

◆ soluție de zaharoză 2%;

◆ acid sulfuric concentrat.

Tehnica de lucru:

► într-o eprubetă se introduc circa 2 ml soluție de bilă sau glicocolat de sodiu;

► se adaugă 0,5 - 1 ml soluție zaharoză;

► se adaugă 2 ml H_2SO_4 concentrat care se prelinge pe pereții eprubetei;

► la limita de separare dintre cele două soluții apare un inel **roșu brun**.

ANEXA I.

MASELE ATOMICE ALE UNOR ELEMENTE IMPORTANTE ÎN LABORATOR CLINIC

Element	Simbol	Masa atomică	Element	Simbol	Masa atomică
Aluminiu	Al	27	Fluor	F	19
Antimoniu	Sb	122	Fosfor	P	31
Argint	Ag	108	Hidrogen	H	1
Arsen	As	75	Iod	I	127
Azot	N	14	Litiu	Li	7
Bariu	Ba	137	Magneziu	Mg	21
Beriliu	Be	9	Mangan	Mn	55
Bismut	Bi	209	Mercur	Hg	201
Bor	B	11	Molibden	Mo	96
Brom	Br	80	Nichel	Ni	58
Cadmiu	Cd	112	Oxigen	O	16
Calciu	Ca	40	Plumb	Pb	207
Carbon	C	12	Potasiu	K	39
Cesiu	Cs	55	Sodiu	Na	23
Clor	Cl	35,5	Seleniu	Se	34
Cobalt	Co	59	Staniu	Sn	50
Crom	Cr	52	Sulf	S	32
Cupru	Cu	63,5	Zinc	Zn	65
Fier	Fe	56	Wolfram	W	184

ANEXA II. **MASELE MOLECULARE ALE UNOR SUBSTANȚE UTILE ÎN LABORATOR CLINIC**

Nr. crt.	Denumirea substanței	Formula moleculară	Masa moleculară
1	Acid acetic	CH_3COOH	60,03
2	Acid azotic	HNO_3	63,02
3	Acid benzoic	C_6H_5-COOH	122,118
4	Acid boric	H_3BO_3	61,84
5	Acid citric	$C_6H_8O_7$	192
6	Acid clorhidric	HCl	36,46
7	Acid formic	HCOOH	46,027
8	Acid fosforic	H_3PO_4	98
9	Acid oxalic	$H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$	126
10	Acid percloric	$HClO_4$	100,46
11	Acid succinic	$H_6C_4O_4$	118
12	Acid sulfuric	H_2SO_4	198
13	Acid tartric	$H_6C_4O_6$	150
14	Acetat de sodiu	$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	136,1
15	Acetat de plumb	$Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$	189,7
16	Acetat de uranil	$UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$	213,2
17	Apă oxigenată	H_2O_2	18
18	Azotat de argint	$AgNO_3$	169,89
19	Azotat de cobalt	$Co(NO_2)_2 \cdot 6H_2O$	145,6
20	Azotat de cupru	$CuNO_3$	125,5
21	Azotat de potasiu	KNO_3	101,1
22	Azotat de plumb	$Pb(NO_3)_2$	165,6
23	Azotat de sodiu	$NaNO_3$	85,01
24	Azotit de sodiu	$NaNO_2$	69
25	Bicarbonat de sodiu	$NaHCO_3$	84,01
26	Borat de sodiu	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	381,42
27	Bromură de potasiu	KBr	119

28	Bromură de sodiu	$NaBr$	102,9
29	Bicromat de potasiu	$K_2Cr_2O_7$	294,22
30	Carbonat de amoniu	$(NH)_2CO_3$	96
31	Carbonat de magneziu	$MgCO_3$	84,32
32	Carbonat de potasiu	K_2CO_3	138,21
33	Carbonat de sodiu anhidru	Na_2CO_3	106
34	Carbonat de sodiu cristalizat	$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$	286,15
35	Cianură de potasiu	KCN	69,11
36	Citrat de amoniu	$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	294,1
37	Clorură de amoniu	NH_4Cl	53,5
38	Clorură de bariu	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	244,31
39	Clorură de calciu	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	219,09
40	Clorură ferică	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,3
41	Clorură de magneziu	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	203
42	Clorură de mangan	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	198
43	Clorură mercurică	$HgCl_2$	271,52
44	Clorură de nichel	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	238
45	Clorură de potasiu	KCl	74,56
46	Clorură de sodiu	$NaCl$	58,45
47	Fosfat de amoniu	$(NH_4)_2HPO_4$	132,06
48	Fosfat monopotasic	K_2HPO_4	174
49	Fosfat dipotasic	KH_2PO_4	136
50	Fosfat monosodic	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	138
51	Fosfat disodic	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	358,16
52	Fericianură de potasiu	$K_3[Fe(CN)_6]$	329,27
53	Ferocianură de potasiu	$K_4[Fe(CN)_6]$	368,36
54	Glicocol	$NH_2CN_2\text{-}COOH$	75
55	Hidroxid de amoniu	NH_4OH	35,05
56	Hidroxid de bariu	$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$	315,6
57	Hidroxid de calciu	$Ca(OH)_2$	74,1

58	Hidroxid de potasiu	KOH	56,11
59	Hidroxid de sodiu	NaOH	40,01
60	Hipoclorit de sodiu	NaOCl	74,5
61	Iodat de potasiu	KIO_3	214,01
62	Iodură de potasiu	KI	166,01
63	Iodură de sodiu	NaI	149,9
64	Molibdat de amoniu	$(NH_4)_2MoO_4 \cdot 4H_2O$	196,03
65	Molibdat de sodiu	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,95
66	Nitroprusiat de sodiu	$Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$	297,95
67	Oxalat de amoniu	$(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$	142,1
68	Permanganat de potasiu	$KMnO_4$	158,04
69	Sare Seignette	$KNaC_4H_4O_6 \cdot 6H_2O$	282,2
70	Sulfat de amoniu	$(NH_4)_2SO_4$	132,15
71	Sulfat de cupru	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249,69
72	Sulfat feros anhidru	$FeSO_4$	151,92
73	Sulfat feros cristalizat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	278,03
74	Sulfat de magneziu	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,6
75	Sulfat de potasiu	K_2SO_4	174,27
76	Sulfat de sodiu anhidru	Na_2SO_4	142,05
77	Sulfat de sodiu cristalizat	$Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$	322,21
78	Sulfat de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,56
79	Sulfocianură de amoniu	NH_4SCN	75,12
80	Sulfit de sodiu	Na_2SO_3	126,05
81	Sulfocianură de potasiu	KSCN	97,18
82	Tiosulfat de sodiu	$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	248,19
83	Wolframat de sodiu	$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	329,86

S_1 1-21 22
S_2 29-46 17
S_3 22-29 7
47-58 11
77-10A. 35

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:

1 ARAMĂ O. — Aplicații ale matematicii în farmacie și medicină, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1987

2 ARSENI C., CHIMION D. — Lichidul cefalo-rahidian, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1979

3 COMOROȘAN S. — Metodele laboratorului clinic, Editura medicală, Bucurști, 1964

4 CUCUIANU M. — Biochimie clinică, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1977

5 CUCUIANU M., RUS H.G., NICULESCU D., VONICA A. — Biochimie. Aplicații clinice, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1991

6 CURTIUS H., MARC ROTH CH. — Clinical biochemistry. Principles and methods. Walter de Gruyter Berlin, New-York, 1974

7 DARIE V. — Biochimie medicală I, Editura Amon, Craiova, 1994

8 DARIE V. — Biochimie medicală II, Editura Universitaria, Craiova, 1997

9 DUMITRU I.F. — Lucrări practice de Biochimie, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1967

10 GRADWOHL H. — Clinical laboratory. Methods and diagnosis. The c.v. Mosby company, Toronto, 1970

11 HARTMANN L. — Techniques modernes de laboratoire et explorationes fonctionelle. Exp. scientifiques francaise Paris, 1970

12 KAPLAN A., LA VERNE S. — Clinical chemistry. Interpretation and techniques, The C.V. Mosby comp., Totonto, 1979

13 KRUH J. — Biochimie. Études médicales et biologiques I, Hermann, Paris, 1982

14 KURCHMEISTER H. — Diagnosticul funcțional clinical, Editura Medicală, București, 1973

15 LITEANU C. — Biochimie analitică, Editura didactică, București, 1976

16 MANTA I., CUCUIANU M., BENGA G., HODÂRNĂU A. — Metode biochimice în laboratorul clinic, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1976

17 MINCU I., POPESCU AURORA, IONESCU TÂRGOVIȘTE C. — Elemente de biochimie și fiziologie a nutriției, Editura medicală, București, 1985

18 MUREȘAN P. — Metode matematice în clinică, laborator și ocrotirea sănătății, Editura medicală, București, 1976

19 MURRAY K. R., GRANNER K.D., MAYES A. P., RODWELL V. W. — Harper's Biochemistry, Lange medical book 1995, London, Sydney, Toronto

20 NUȚA GHE., BUȘNEAG C. — Investigații biochimice, Editura didactică și pedagogică, București, 1977

21 OLINESCU R. — Metode biochimice de laborator clinic, Editura Cerma, București, 1993

22 POLONOVSKI M. — Biochimie medicală, Ed. Masson, Paris, 1963

23 POPA G. — Citodiagnosticul prin puncție în practica medicală. Editura medicală, București, 1971

24	POPESCU A.	Fundamentele biofizicii medicale, vol.I, Editura All, București, 1994
25	RADU M. V.	Sistemul internațional de unități în medicină, Editura Medicală, București, 1986
26	RICHTERICH R.	Clinical chemistry. Theory and practice. Acad press New-York, 1969
27	RODIER J., MALLEIN R.	Manual de Biochimie practique, Paris, 1967
28	ȘERBAN M., G. CÂMPEANU, IONESCU EMANUELA	Metode de laborator în biochimia animală, Editura didactică și pedagogică, București, 1993
29	TĂNĂSESCU D., DARIE V., GRIGORESCU MARGARETA, RADULIAN ILEANA	Lucrări practice de biochimie medicală, vol.I, Reprografia Universității din Craiova, 1983
30	TĂNĂSESCU D., DARIE V., GRIGORESCU MARGARETA, RADULIAN ILEANA	Lucrări practice de biochimie medicală, vol.II, Reprografia Universității din Craiova, 1991
31	TIETZ N.	Fundamentals of chimical chemistry, W.B. Saunder Comp. Philadelphia, London, Toronto, 1976
32	ZAMFIRESCU GHEORGHIU MARCELA, GEORGESCU I., RĂDULESCU ȘTEFANIA, VLĂESCU C., SUCIU AGATA	Instrucțiuni pentru raționalizarea investigațiilor în laboratorul de chimie clinică. Uz intern, București, 1983